

**EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR
ANTIKÖRPERABHÄNGIGEN ZELLVERMITTELTEN
ZYTOTOXIZITÄT GEGEN SPONTANE
GLIOME DES HUNDES**

SIMON AUMANN

1987

Disbui. München
1987



Aus dem
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
Vorstand Prof. Dr. E. Dahme
am Institut für Tierpathologie der Universität München

Angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. E. Dahme

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR
ANTIKÖRPERABHÄNGIGEN ZELLVERMITTELTEN ZYTOTOXIZITÄT
GEGEN SPONTANE GLIOME DES HUNDES

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität München

von
Simon Aumann
aus Zillendorf
München 1986

Die Rückseite des Titelblattes lautet:

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: ----- Prof. Dr. H. Zucker -----

Referent: ----- Prof. Dr. E. Dahme -----

Korreferent: ----- Prof. Dr. H.P. Jennissen -----

Tag der Promotion: ----- 27. Februar 1987 -----

Inhaltsübersicht

		Seite
A	Einleitung	1
B	Literaturübersicht	3
1	Antigenität von Hirntumoren	3
2	Monoklonale Antikörper gegen tumor-assozierte Antigene	4
3	Die ADCC in der Tumorthherapie	6
4	Untersuchungen der ADCC in vitro	9
5	Einfluß der Effektorzellen und Antikörperklassen auf die ADCC	10
C	Eigene Untersuchungen	13
1	Material und Methoden	13
1.1	Versuchstiere	13
1.2	Tumoren	13
1.2.1	Primärtumoren	13
1.2.1.1	N 166/77	13
1.2.1.2	N 422/83	14
1.2.1.3	N 79/41	15
1.2.2	Zellkulturen	16
1.2.3	Etablierung von Meningomzellkulturen in vitro	16
1.2.4	Transplantationstumoren	18
1.2.4.1	Subkutane Transplantate	18
1.2.4.2	Intracerebrale Transplantate	18
1.3	Produktion und Charakterisierung monoklonaler Antikörper	19
1.3.1	Immunisierung	19
1.3.2	Milzzellen	19
1.3.3	Serumgewinnung	20
1.3.4	Myelomzellen	20
1.3.5	Zellfusionen	21
1.3.6	Nachweis gliombindender Antikörper	22
1.3.6.1	Indirekte Immunperoxidasefärbung	22
1.3.6.2	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)	24
1.3.7	Hybridomselektion	25
1.3.8	Hybridomklonierung	26
1.3.9	Absorptionsversuche	27
1.3.10	Hybridomkonservierung	27
1.3.11	Kreuzreaktionen mit anderen Tumorzelllinien	28
1.3.12	Anreicherung von Immunglobulinen mittels Ammoniumsulfatpräzipitation	29
1.3.13	Bestimmung des Immunglobulingehaltes	29

1.3.14	Gewinnung von serumfreien HybridomÜberständen	30
1.3.15	Bestimmung der Immunglobulinklassen und -isotypen	30
1.4	Koppelung von Biotin an monoklonale Antikörper	31
1.5	Lichtmikroskopische Darstellung der Antikörperbindung	32
1.5.1	Zellkulturen	32
1.5.2	Gewebeschnitte	33
1.5.2.1	Paraffinschnitte	33
1.5.2.2	Kryostatschnitte	34
1.6	Elektronenmikroskopische Darstellung der Antikörperbindung	35
1.6.1	Zellkulturen	35
1.7	Gewinnung von Effektorzellen	36
1.7.1	Thioglycollate-stimulierte Peritoneal-Makrophagen	36
1.7.2	T-Lymphozyten	37
1.8	Licht- und elektronenmikroskopische Darstellung der ADCC	38
1.9	Colony-Formation-Inhibition-Assay (CFIA)	41
1.10	ADCC-Versuche in vivo	42
2	Ergebnisse	44
2.1	Zellkulturen	44
2.2	Transplantationstumoren	45
2.3	Monoklonale Antikörper	46
2.3.1	Hybridome	46
2.3.2	Allogene und xenogene monoklonale Antikörper	47
2.3.3	Quantitative Absorption	49
2.3.4	Kreuzreaktionen mit anderen Tumorzellen	51
2.3.5	Bestimmung von Immunglobulinklassen und -isotypen	53
2.4	Immunochemische Darstellung der Antikörperbindung	54
2.4.1	Lichtmikroskopie	54
2.4.1.1	Gliomzellkulturen	54
2.4.1.2	Gewebeschnitte	55
2.4.2	Elektronenmikroskopie	58
2.4.2.1	Gliomzellkulturen	58
2.5	Koppelung von Biotin-markierten monoklonalen Antikörpern an Effektorzellen	58
2.6	Colony-Formation-Inhibition-Assay (CFIA)	60
2.7	ADCC-Versuche in vivo	72
2.8	Licht- und elektronenmikroskopische Darstellung der ADCC	78
D	Diskussion	85
E	Zusammenfassung - Summary	94
F	Literaturverzeichnis	98

A Einleitung

Maligne Gliome zählen nach wie vor zu den prognostisch ungünstigsten Tumoren (Mahaley, 1972; Walker et al., 1978). Durch den Nachweis der Expression gliomassoziiertter Antigene an der Oberfläche humaner (Coackham et al., 1980; Schnegg et al., 1981b; Sikora und Philips, 1981; Seeger et al., 1981; Wikstrand und Bigner, 1982; de Muralt et al., 1985) und experimenteller (Stavrou et al., 1983; 1984) Gliomzellen werden neben chirurgischen, chemotherapeutischen und radiologischen zunehmend immunologische Methoden in Diagnose und Therapie der Gliome einbezogen. Besonderes Interesse kommt dabei der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC; Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) zu, die erstmals im Jahre 1965 von Möller beschrieben wurde. Die ADCC wird definiert als Funktion nativer Effektorzellen, sich über einen Antikörper an Zielzellen zu binden und diese zu lysieren. Als Effektorzellen kommen dabei solche Zellen in Betracht, die über einen Fc-Rezeptor für Immunglobuline verfügen und somit in der Lage sind, mit dem an ein Antigen der Zielzelle gebundenen Antikörper zu reagieren (Imai et al., 1981; Byfield et al., 1982).

Die zur Untersuchung der antigenen Eigenschaften von Gliomen und in experimentellen Behandlungsversuchen eingesetzten polyklonalen Heteroantisera aus immunisierten Versuchstieren konnten auch nach aufwendigen Absorptionen zur Entfernung kontaminierender Begleitantikörper den Anforderungen nicht genügen (Coackham, 1974; Wahlström et al., 1974; Wikstrand et al., 1977; Wikstrand et al., 1979; Schnegg et al., 1981a). Die für eine therapeutische Nutzung der ADCC entscheidende

Voraussetzung der Monospezifität und -isotypie des verwendeten Antikörpers wurde durch die Entwicklung der Hybridomtechnik zur Produktion von monoklonalen Antikörpern mit prädefinierter Spezifität durch Köhler und Milstein im Jahre 1975 geschaffen.

Mit Hilfe solcher monoklonaler Antikörper gelang es inzwischen, zytotoxische Reaktionen unterschiedlicher Effektorzellen gegen neuroektodermale Tumorzellen zu induzieren (Byfield et al., 1982; Bilzer et al., 1984; Herlyn et al., 1985).

In die Möglichkeit, Tumoren mit Hilfe natürlicher Immunmechanismen zu therapieren, werden große Erwartungen gesetzt. Dies gilt insbesondere für die Unterdrückung der Metastasierung oder die Zerstörung sehr kleiner Tumoresiduen nach chirurgischer Entfernung des Tumors. Der Wert dieser Therapieformen wird in großem Maße davon abhängig sein, ob es gelingt, Antikörper mit hohen Affinitäten gegenüber den Zielzellen zu finden.

B Literaturübersicht

1 Antigenität von Hirntumoren

Es kann als gesichert gelten, daß Tumorzellen gegenüber nicht blastomatisierten Zellen veränderte Antigenstrukturen exprimieren (Klein, 1966; Hellström et al., 1968; Old et al., 1969; Baker et al., 1973; Herbermann, 1977). Durch Untersuchungen der humoralen und zellulären Immunantwort bei spontanen (Wahlström et al., 1973; Kornblith et al., 1974; Solheid et al., 1976; Pfreundschuh et al., 1978; Coakham et al., 1980) und experimentellen Gliomen (Cravioto, 1978; Stavrou et al., 1978; Bilzer et al., 1982), konnten gliomassoziierte Antigene als Ausdruck der malignen Transformation glialer Zellen nachgewiesen werden.

Seit der Etablierung der Hybridomtechnologie können durch den Einsatz spezifischer monoklonaler Antikörper Vorkommen und Verteilung von Antigenen sicher erkannt werden. Die bisher durch monoklonale Antikörper definierten tumorassoziierten Antigene humaner neuroektodermaler Tumoren werden von Wikstrand und Bigner (1985) in vier Gruppen eingeteilt:

a) Biochemisch definierte Zellmarker wie GFAP (glial fibrillary acidic protein) und S-100 (soluble in 100 % Ammoniumsulfat), Galactocerebrosid und verschiedene Ganglioside in den Zellmembranen von Melanom-, Gliom- und Neuroblastomzellen (Cahan et al., 1982; Pukel et al., 1982; Dippold et al., 1984).

b) Antigene, die sowohl auf neuroektodermalen als auch auf lymphatischen Zellen vorkommen. Das bereits 1964 von Reif und Allen mit Hilfe polyvalenter Antiseren entdeckte gemeinsame Vorkommen bestimmter Antigene auf

Nerven- und Lymphzellen konnte inzwischen durch Einsatz monoklonaler Antikörper bestätigt werden (Oger et al., 1982; Seeger et al., 1982; Carrel et al., 1983; Helson et al., 1983).

c) Gemeinsame Antigene auf neuroektodermalen und onkofetalen Geweben. Hierzu zählen Antigene verschiedener neuroektodermaler Tumoren wie Gliome, Melanome, Neuroblastome und Schwannome, die mit denselben monoklonalen Antikörpern reagieren (Herlyn et al., 1980; Carrel et al., 1982; deTribolet, 1982; Saxton et al., 1983), sowie Antigene, die außer auf neurogenen Tumorzellen auch auf onkofetalen Zellen nachweisbar sind (Kennett et al., 1979; Dippold et al., 1980; Brown et al., 1981; Seeger et al., 1981; Wikstrand et al., 1982).

d) Tumorspezifische Antigene, welche ausschließlich auf den Zellen der jeweiligen Tumorart exprimiert werden. Monoklonale Antikörper, die nur mit einer Tumorzellart reagieren, wurden bei humanen Melanomen von Houghton et al. (1983), bei humanen Gliomen von Sikora und Alderson (1982) sowie bei experimentellen Gliomen von Stavrou et al. (1978) und Lee et al. (1984) beschrieben.

2 Monoklonale Antikörper gegen tumorassoziierte Antigene

Infolge heterogener Antikörperpopulationen und niedriger Antikörpertiter ist eine Reindarstellung von spezifisch gegen tumorassoziierte Antigene gerichteten Antikörpern aus dem Serum von Tumorträgern kaum möglich. Köhler und Milstein (1975) gelang es, Hybridzellen durch Verschmelzung von Myelomzellen mit sensibilisierten Milzzellen herzustellen, die in sich entscheidende

Eigenschaften der Elternzellen vereinigen: Die Immortalität der Myelomzelle und die Antikörperproduktion der Plasmazelle. Mit einer bereits 1964 von Littlefield entwickelten Methode können durch Verwendung eines Hypoxanthin-, Aminopterin- und Thymidin-haltigen Mediums fusionierte von nicht-fusionierten Myelomzellen getrennt werden.

Inzwischen wurde weltweit eine Vielzahl monoklonaler Antikörper gegen menschliche und tierische Tumoren produziert. Damit konnten tumorassoziierte Antigene besser untersucht und neu definiert werden. Unter anderem wurden monoklonale Antikörper produziert gegen Melanome (Koprowski et al., 1978; Herlyn D. et al., 1979, 1980; Yeh et al., 1979, 1981; Dippold et al., 1980; Seeger et al., 1981; Carrel et al., 1982; Garrigues et al., 1982; Übert et al., 1980; Mitchell et al., 1981; Vollmers et al., 1983; Widmo et al., 1984), Gliome (Schnegg et al., 1981; Seeger et al., 1981; Sikora et al., 1981, 1982; Carrel et al., 1982; de Muralto et al., 1982; Wikstrand et al., 1982; Fabre et al., 1982; Bourdon et al., 1983) und Neuroblastome (Eisenbart et al., 1982; Kennet et al., 1979, 1980; Seeger et al., 1981; Carrel et al., 1982) des Menschen, sowie unter anderem auch gegen ein experimentelles Gliom der Ratte (Stavrou et al., 1982). Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern ließen ein breites Spektrum der tumorassoziierten Antigene erkennen: So wurden Antikörper gefunden, die ausschließlich mit Melanomzellen reagieren (Garrigues et al., 1982; Ross et al., 1982; Hellström et al., 1983; Libert et al., 1983), aber auch solche, die mit Melanomen und Gliomen reagieren (Mitchell et al., 1981; de Muralto et al., 1982). Von Seeger et al. (1981) wurden zwei monoklonale Antikörper beschrieben, die Antigene auf Melanom-, Gliom-, Neuroblastom- und fetalen Hirnzellen erkennen, während sie nicht mit adulten Hirnzellen,

Karzinom- oder Teratomzellen reagieren. Auch Wikstrand et al. (1992) und Kennet et al. (1979, 1980) fanden Kreuzreaktionen von monoklonalen Antikörpern gegen fetale Hirnzellen des Menschen mit Glioblastomen, Melanomen und Neuroblastomen, nicht jedoch mit normalen adulten Geweben oder Tumoren anderer Keimblätter. Tomita et al. führten 1983 Untersuchungen mit einem monoklonalen Antikörper durch, der Antigene sowohl auf Zellen der Mausmelanomlinie B16 als auch auf Mauseiweißmin erkennt.

3 Die ADCC in der Tumorthherapie

Seit vielen Jahren wird weltweit an der Immuntherapie von Tumoren gearbeitet, wobei in den letzten Jahren eine Intensivierung der Bemühungen auf dem Gebiet der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC: Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) festzustellen ist.

Erstmals wurde die ADCC im Jahre 1965 von Moller beschrieben, welche beobachtete, daß nicht-sensibilisierte Mäuselymphozyten in der Gegenwart von syngenen Antiserum gegen das H-2-Antigen der Targetzelle fähig sind, allogene Sarkomzellen zu zerstören. Wichtige erste Arbeiten über die ADCC wurden von Perlmann und Holm (1969), MacLennan (1972) und Perlmann et al. (1972) herausgegeben.

Benacerraf und Unanue (1982) definieren die ADCC als Vorgang, bei dem sich spezifische Antikörper an Antigene der Zielzelle binden und dadurch nicht sensibilisierte Effektorzellen via Fc-Rezeptor-Kontakt befähigen, die Zielzelle zu lysieren.

Für die Möglichkeit der therapeutischen Nutzung dieses Effekts im Rahmen der Immuntherapie von Tumoren war die

von Köhler und Milstein 1975 etablierte Hybridom-technologie zur Herstellung monoklonaler Antikörper eine wichtige Voraussetzung. Mit dieser Technik können Antikörper mit prädefinierter Spezifität gegen tumor-assoziierte Antigene in beliebiger Menge hergestellt werden. Dadurch können die durch die Polyklonalität herkömmlicher Antisera bedingten Nachteile (z.B. kontaminierende Begleitantikörper) vermieden werden. Die Erkenntnis, daß zellvermittelte Immunreaktionen gegen Geschwulstzellen durch Antikörper vermittelt sein können, stammt von O'Toole et al. (1973) aus Untersuchungen über die zellvermittelte Immunität gegen Harnblasenkrebs. Zu ähnlichen Schlußfolgerungen kamen 1974 auch Devries et al. in ihren Versuchen über Zytotoxizität von Lymphozyten gegen Melanomzellkulturen. 1979 stellten Herlyn et al. fest, daß Milzzellen in Kombination mit monoklonalen Melanom-Antikörpern in ADCC - Versuchen auf Melanomzellen zytotoxisch wirkten. Ebenfalls mit monoklonalen Antikörpern gegen menschliche Melanomzellen und Maussplenozyten als Effektorzellen demonstrierte Imai 1981 die Wirksamkeit der ADCC. 1985 verwendeten Herlyn et al. mit großem Erfolg Makrophagen als Effektorzellen. Sears et al. führten 1984 einen Therapieversuch bei 20 Patienten mit metastasierenden Adenokarzinomen des Gastrointestinaltrakts durch, welche sie mit einmaligen Injektionen von 15 bis 1000 mg eines gegen ein humanes Kolorektalkarzinom gerichteten Antikörpers behandelten. In drei Fällen bildeten sich die Metastasen zurück, bei anderen Patienten konnte das Wachstum der Tochtergeschwulste gebremst oder beendet werden. 1985 erreichte Bilzer mit Antikörper-gekoppelten syngenen T-Lymphozyten eine Wachstumsdepression von sekundären intracranialen Transplantationstumoren eines mit N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff induzierten Rattenglioms.



Ein bedeutender Nachteil der ADCC-Therapie von humanen Tumoren besteht jedoch in der notwendigen Quantität des zu verabreichenden Antikörpers, was die Gefahr von Immunreaktionen des Patienten gegen das Fremdeiweiß der meist von Mauszellen produzierten Antikörper in sich birgt. Außerdem konkurriert der verabreichte Antikörper mit unspezifischen IgG-Komplexen um den Fc-Rezeptor der Effektorzelle, so daß sich nur ein Bruchteil der Effektorzellen mit dem spezifischen Antikörper verbinden kann (MacLennan, 1972). Um diese Nachteile auszugleichen, entwickelten Jones und Segal 1980 ein Verfahren, bei dem die Effektorzellen in vitro mit dem Antikörper gekoppelt werden. Die solchermaßen "frankierten" Effektorzellen erwiesen sich als hochzytotoxisch gegenüber den Zielzellen. Darüberhinaus soll bei diesem Verfahren die Menge des benötigten Antikörpers um den Faktor 10 geringer sein als in der klassischen ADCC. Monoklonale Antikörper gegen tumorassoziierte Antigene stellen ein sehr erfolgversprechendes Agens für die Immuntherapie von Tumoren dar. Die Tatsache, daß bei einigen Tumorarten tumorassoziierte Antigene nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnten, läßt denkbar erscheinen, daß es sich bei tumorassoziierten Antigenen um Differenzierungsantigene handeln könnte, die auch von Tumorzellen exprimiert werden können. Die Anwendbarkeit monoklonaler Antikörper gegen Differenzierungsantigene bei der Tumorthherapie wurde experimentell unter anderem von Bernstein et al. (1980), Miller und Levy (1981), Miller et al. (1981), Young et al. (1981), Ritz et al. (1981), Dillman et al. (1982) Miller et al. (1982) und Epenetos et al. (1985) untersucht.

4 Untersuchung der ADCC in vitro

Für die Untersuchung der ADCC wurden mehrere in vitro Zytotoxizitätstests entwickelt.

Der Chrom⁵¹-Release-Assay (Vainio et al., 1964; Wigzell, 1965), ist ein Test, bei dem die Targetzellen mit ⁵¹Cr markiert und nach der Inkubation mit Antikörper und Effektorzellen das Ausmaß der Targetzell-Lysis durch Messung der 'counts per minute' im zellfreien Überstand bestimmt werden.

Ein weiterer oft angewandeter Test ist der Mikrozytotoxizitätstest nach Takasugi und Klein (1970) bzw. eine Modifikation desselben nach Hellström et al. (1971), bei dem die Zielzellen in Mikrotestplatten mit Antikörper und Effektorzellen inkubiert werden; nach einer Inkubationszeit von 1 bis 6 Stunden werden die Zellen gewaschen, fixiert, gefärbt und die überlebenden Zellen im Mikroskop gezählt. Dieser Test beinhaltet mehrere Probleme: die Subjektivität der optischen Auswertung, die Beschränkung auf plastik- oder glasadhärente Zielzellen und die Tatsache, daß das Endresultat an einer Zellkultur abgelesen wird, in der mehrere Vorgänge interferieren: Zelltod, Zytostase und Zellwachstum.

Eine weitere Methode ist der Colony-Inhibition-Test nach Hellström (1967) und Hellström et al. (1969, 1971). In diesem Test werden die Zielzellen in Gewebekulturflaschen ausgesät und einige Tage mit Antikörper und Effektorzellen bebrütet. Nach dieser Zeit wird die Anzahl der Zellkolonien gezählt und in Relation zu der Kolonienzahl in Kontrollansätzen gesetzt. Daraus wird der zytotoxische Index berechnet. Eine Abwandlung dieses Colony-Inhibition-Tests wird bei Herlyn und Koprowski (1982) beschrieben, die die Inkubation von Zielzellen, Effektorzellen und Antikörper in den Löchern einer 24-Linbroplatte vornehmen. Nach einigen Tagen

Inkubation werden die Zellen abtrysiniert, in einer Soft-Agarlösung suspendiert, in Petrischalen ausgesät und einige Tage inkubiert. Danach werden die im Agar gewachsenen Kolonien gezählt.

5 Einfluß der Effektorzellen und Antikörperklassen auf die ADCC

Über die Frage, welche Zellen die ADCC vermitteln können und als Effektorzellen in Betracht kommen, herrscht Uneinigkeit. Zum Teil kann dies auf unterschiedliche Testsysteme zurückgeführt werden. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß unterschiedliche Ziel- und Effektorzellen verschiedener Spezies sowie Antikörper verschiedener Immunglobulinklassen zu unterschiedlichen Schlußfolgerungen führen.

Früher wurde aus der Feststellung, daß die Entfernung phagozytierender und Thymus-abhängiger Zellen aus Milz-zellpopulationen die Effektivität der ADCC nicht verringert (Harding, 1971; von Boxel, 1972) geschlossen, daß die ADCC von B-Lymphozyten vermittelt wird.

1973 fanden aber Greenberg et al., daß nach Entfernung der B-Lymphozyten die ADCC in gleichem Umfang ablief. Sie definierten daraufhin 1975 die Effektorzelle der ADCC als eine 'nicht zu den B-Lymphozyten gehörende, nicht phagozytiierende, Fc-Rezeptor-positive, Immunglobulin-negative Zelle' und bezeichneten sie als Killer- oder K-Zelle.

Santoni definierte 1979 die Effektorzelle als Fc-Rezeptor-positiven, nicht adhärenenten, nicht phagozytierenden Lymphozyten der T-Zelllinie.

Herlyn et al. (1982) fanden einzig und allein Makrophagen als aktive Effektorzellen, da nach deren Inaktivierung durch Silikonpartikelchen keine Tumorsuppression

als ADCC-Effekt zu verzeichnen war. Auch Steplewski (1983) ist der Meinung, daß allein Makrophagen als Effektorzellen dienen.

Bei van Oers (1977), Gupta et al. (1978), Lamon (1982) und Miedema (1984) dagegen erwiesen sich Thymozyten als potente Effektorzellen. Zöller et al. (1982,1983) fanden im Thymus eine kleine Population von Zellen mit T-Zell-Charakteristika (nicht adhärent, nicht phagozytierend, Oberflächen-Immunglobulin negativ, C3-Rezeptor negativ, Fc γ -Rezeptor positiv, Thy-1 positiv), welche ein hohes zytolytisches Potential gegen IgG-bedeckte Erythrozyten und Fibrosarkomzellen hatte. Sie konnten in ihren Untersuchungen die Beteiligung von Makrophagen als Effektorzellen ausschließen.

Eine große Rolle bei der Frage nach der Natur der Effektorzelle scheint also die Art der in der jeweiligen Untersuchung benutzten Targetzelle zu spielen; die Grundvoraussetzung für eine Effektorzelle ist jedenfalls das Vorhandensein von Fc-Rezeptoren, woran sich der Antikörper mit seinem Fc-Teil binden kann.

Auch die Frage nach der Abhängigkeit der ADCC von der Klassen- und Subklassenzugehörigkeit des verwendeten Antikörpers wurde in den vergangenen Jahren von vielen Wissenschaftlern geprüft. Vor allem in den ersten Jahren der ADCC-Untersuchungen bestand sehr oft die Meinung, daß allein Antikörper der IgG-Klasse wirksam werden können (MacLennan, 1972; Perlmann, 1972; Cerottini, 1974). Inzwischen wurde aber in erster Linie von Lamon und seinen Mitarbeitern gezeigt, daß auch IgM-Antikörper in der Lage sind, antikörperabhängige zytotoxische Reaktionen zu vermitteln. (Lamon et al., 1975a, 1975b, 1977, 1982). Diese IgM-abhängige zelluläre Zytotoxizität wurde unter anderem von Blair et al. (1976), Wählin et al. (1976) und Zöller et al. (1983) bestätigt.

Herlyn und Koprowski (1982) konnten dagegen bei Behandlungsversuchen von Melanom- bzw. Kolorektalkarzinom-Transplantaten tragenden Nacktmäusen mit 33 monoklonalen Antikörpern der Klassen IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM und IgA nur mit IgG2a-Antikörpern einen Behandlungserfolg erzielen. Auch Langlois et al. (1981) stellten fest, daß zwar IgG2a-Antikörper murine Adenokarzinom-Transplantate über den Mechanismus der ADCC zerstören, nicht aber IgG2b-Antikörper. Zu ähnlichen Resultaten kamen auch Seto et al. (1983). Gegen humane Melanomzellen als Zielzellen konnte Imai 1981 sowohl mit IgG2a- als auch mit IgG1-Antikörpern zellvermittelte Zytotoxizität hervorrufen.

C Eigene Untersuchungen

1 Material und Methoden

1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten BALB/c-Mäuse beiderlei Geschlechts, BALB/c-nu/nu-Mäuse (thymuslose Nacktmäuse) männlichen Geschlechts im Alter von fünf bis acht Wochen, sowie Inzucht-Fischer-Ratten (F 344) beiderlei Geschlechts. Die Tiere wurden in Macrolon^R-Käfigen gehalten und erhielten eine Standarddiät (BALB/c-Mäuse und Fischer-Ratten Altromin^R, BALB/c-nu/nu-Mäuse Altromin 1414^R - Sonderanfertigung für Nacktmäuse und Nacktratten) und Wasser ad libitum. Das den Nacktmäusen angebotene Wasser wurde mit HCl auf pH 3,0 angesäuert.

1.2 Tumoren

1.2.1 Primärtumoren

1.2.1.1 N 166/77

Der Tumor N 166/77 (Müller, 1978; Dähme et al., 1980) wurde aus dem rechten Lobus piriformis einer 7-jährigen Boxer-Hündin entnommen. Er war von grauweißer Farbe, etwa kirschgroß, unscharf vom umgebenden Gewebe abgegrenzt und mit einzelnen petechialen Blutungen durchsetzt.

In histologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen (Müller, 1978) zeigte sich, daß der Tumor aus fortsatzreichen, kleinen bis mittelgroßen Zellen mit

rundlichen bzw. länglich-gebogenen Kernen besteht, deren Heterochromatin unregelmäßig klumpenförmig entlang der Membran angeordnet ist. Mitosefiguren finden sich nur sehr selten. Das insgesamt lockere Gewebe des Tumors ist frei von Nekrosen, und weist häufige Kugelblutungen auf. Im schmalen Zytoplasmasaum finden sich zahlreiche Mitochondrien, Polysomen, ein gut entwickeltes raues endoplasmatisches Retikulum und teils ungeordnet, teils gebündelt nebeneinander liegende Gliafilamente.

Immunhistochemische Untersuchungen von Tumorschnitten (Schmitt, 1986) mittels der PAP-Technik zeigten in fast allen Zellen das Vorkommen von astrozytenspezifischem GFA-Protein (glial fibrillary acidic protein) und Protein S-100 (soluble in 100 % Ammoniumsulfat). Neuronenspezifische Enolase (NSE) und Fibronektin konnten dagegen nicht nachgewiesen werden.

Aufgrund der genannten Merkmale und Befunde wurde der Tumor als gut differenziertes kleinzelliges Astrozytom klassifiziert.

1.2.1.2 N 422/83

Der etwa kirschgroße Tumor N 422/83 stammt aus der rechten Großhirnhemisphäre einer 5-jährigen Boxer-Hündin und reichte in Höhe des Sulcus cruciatus vom Seitenventrikel bis zur Meninx. Er war von weißlicher Farbe, ohne erkennbare Nekrosen und von zerfließlich-sulziger Konsistenz.

Histologisch (Schmitt, 1986) zeigt sich, daß der Tumor aus zellreichem, gut vaskularisiertem Gewebe mit starker, ungeordneter Proliferation perivaskulärer Zellen besteht, wodurch er einen gekammerten Aufbau erhält. Zwischen den Gewebssägen bilden dicht liegende, durch

kurze Fortsätze verbundene, zytoplasmaarme Zellen ein wabenartiges, feinmaschiges Netzwerk. Es treten zahlreiche Mitosen auf. Zwischen diesen Zellen mit runden bis ovalen Kernen mit mittlerem Gehalt an randständigem Chromatin liegen vereinzelt Zellen mit großen ovoiden, chromatinreichen Kernen von unregelmäßiger Form. Um viele eosinophile Verschleimungsfelder sind die Tumorzellen oft in palisadenartigen Reihen angeordnet. In der Umgebung kleinerer Gefäße kommt es häufig zur Bildung von Pseudorosetten.

Immunohistochemische Untersuchungen ergaben kein Vorkommen von Protein S-100, NSE und Fibronektin. GFAP konnte in wenigen langen Zellfortsätzen von Zellen an der Tumorpherie nachgewiesen werden.

Die genannten Befunde sprechen für das Vorliegen eines anaplastischen Oligodendroglioms Grad III bis IV.

1.2.1.3 N 79/41

Das experimentelle Rattengliom N 79/41 (Stavrou et al., 1983) wurde postnatal in einer Fischer-Ratte durch wöchentliche Applikation von 6 mg/kg N-Methyl-N-Nitrosourostoff über das Trinkwasser induziert (Stavrou et al., 1980). Es war von etwa Kirschkergröße und in der rechten Großhirnhemisphäre lokalisiert.

Dieser Tumor besteht aus pleomorphen, mittelgroßen Zellen mit ovalen bis runden dichten Kernen. Mitosen und Riesenzellen sind häufig.

Von den meisten Tumorzellen wird GFA-Protein und Protein S-100 exprimiert.

Der Tumor wurde als pleomorphes Astrozytom Grad II klassifiziert (Stavrou et al., 1983).

1.2.2 Zellkulturen

Von den drei genannten Primartumoren wurden durch Explantation von frischem Tumorgewebe in vitro permanente Zelllinien etabliert: 770G-G-166 (1977, DOG, Glioma, Nr. 166), 830G-G-422 und 79FR-G-41 (1979, Fischer-Rat, Glioma, Nr. 41).

Die Gliomzelllinien wurden in 50 ml und 260 ml Plastikflaschen (Nunc^R, Roskilde, Dänemark; 1-53732), bzw. bei höherem Bedarf in silikonisierten (1 l)-Glaskulturflaschen mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Paisley, Schottland; 074-2100) als Nährmedium, welchem 10 % fetales Kälberserum (FKS, Flow Lab., Neckenheim; 29-101-54) sowie pro Liter 10 ml einer 8,8 %igen NaHCO_3 -Lösung, 0,1 g Neomycin und 100000 I.E. Penicillin G zugesetzt wurden, kultiviert.

Die als Monolayer wachsenden Zellen wurden zweimal in der Woche mit einer STV-Lösung (100 ml Saline 10fach, 25 ml 25 %ige Trypsinlösung, 50 ml 0,1 %ige Versenolösung, Aqua bidest. ad 1000 ml) im Verhältnis 1 : 30 (79FR-G-41) bzw. 1 : 20 (770G-G-166 und 830G-G-422) geteilt.

Die Bebrütung der Zellkulturen erfolgte bei 37 °C im geschlossenen System.

1.2.3 Etablierung von Meningomzellkulturen in vitro

Die Hundemeningome N 423/85 und N 478/85 (Bezeichnung der Kulturen: 850G-Mg-423 und 850G-Mg-478) wurden unter sterilen Bedingungen entnommen und auf drei Arten weiterbehandelt:

a) Mit der Skalpellklinge wurden sehr kleine Partikel ($< 1 \text{ mm}^3$) des Tumorgewebes abgetrennt und in ca. 1 cm Abstand voneinander auf den Boden einer 50 ml Plastikgewebekulturflasche gelegt. Nach ca. 5 min. hafteten die Gewebestückchen am Boden der Flasche fest und wurden mit DMEM/20 % FKS (Medium wie unter 1.2.2, aber mit 20 % FKS) überschichtet und im geschlossenen System bebrütet.

b) Ein etwa kirschkerngroßes Tumorstück wurde vorsichtig und unter Zutropfen von DMEM/20 % FKS durch ein steriles Sieb mit einer Maschenweite von $60 \mu\text{m}$ gedrückt. Die Gewebepartikel wurden mit einer 10 ml Pipette in Suspension gebracht, in 20 ml DMEM/20 % FKS in eine 260 ml Plastikflasche gegeben und bei 37°C im geschlossenen System inkubiert.

c) Mit einer Skalpellklinge klein geschnittene Tumorgewebestückchen wurden in ein steriles Zentrifugenglas mit 1,25 %iger Trypsinlösung gelegt und 5 min darin belassen. Durch eine kurzzeitige Zentrifugation (2 min, 500 g) wurden größere Stücke sedimentiert, losgelöste Zellen wurden dekantiert. Dieser Vorgang wurde sooft wiederholt, bis die Gewebestückchen ganz 'verdaut' waren. Der gesammelte Überstand wurde dann 10 min bei 1000 g zentrifugiert, in DMEM/20 % FKS suspendiert, in Gewebekulturflaschen ausgesät und bei 37°C im geschlossenen System inkubiert.

Bei beiden Tumoren konnten mit der Trypsin-Verdauungsmethode (c) die besten Ergebnisse erzielt werden. Nach dem zweiten Splitten wurde die FKS-Konzentration im Medium auf 15 %, nach dem 4. Splitten auf 10 % erniedrigt. Beide Zellkulturen zeigten gutes Wachstum und wurden nach der 10. in vitro Passagierung eingefroren.

1.2.4 Transplantationstumoren

Aus den Zelllinien 77DG-G-166, 83DG-G-422 und 79FR-G-41 wurden Transplantationstumoren für histologische, immunhistochemische und ultrastrukturelle Untersuchungen bzw. für Behandlungsversuche erzeugt, indem subkonfluent gewachsene Gliomzellen vom Kulturgefäßboden abtrypsiniert und Versuchstieren transplantiert wurden.

1.2.4.1 Subkutane Transplantate

Von den Zelllinien 77DG-G-166, 83DG-G-422 und 79FR-G-41 wurden subkutane Transplantationstumoren (TT) in BALB/c-nu/nu-Mäusen durch Injektion von je 2×10^6 (Zählung mit elektronischem Zählgerät, Coulter Electronics LTD, Harpenden, England) in 0,5 ml Medium suspendierten Zellen in die regio dorsoscapularis erzeugt.

Nach durchschnittlich zwei Wochen entwickelten sich etwa kirschgroße, gut abgesetzte Tumoren ohne sichtbare Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens der Trägartiere. Diese Tumoren wurden nach Euthanasie der Tiere entnommen und für weitere Untersuchungen fixiert oder tiefgefroren.

1.2.4.2 Intracerebrale Transplantate

Die Rattengliomzelllinie 79FR-G-41 wurde zur Aufrechterhaltung der Tumorigenität intracerebral in Fischer-Ratten transplantiert. Dazu wurden jeweils 1×10^6 Zellen in 50 µl PBS-A suspendiert und mit einer No. 17-Injektionsnadel 10 Tage alten Ratten paramedian in Höhe des Scheitelbeins in die Großhirnrinde inokuliert (Bilzer, 1980). Nach etwa 10 bis 20 Tagen zeigten sich

bei den Ratten deutliche Ausfallserscheinungen (schiefe Kopfhaltung, unsicherer Gang, bzw. Paresen usw.), worauf die Tumoren nach Euthanasie der Tiere entnommen wurden.

1.3 Produktion und Charakterisierung monoklonaler Antikörper

1.3.1 Immunisierung

6 Wochen alte, weibliche BALB/c-Mäuse wurden mit Gliomzellen der Linien 770G-G-166 und 830G-G-422 immunisiert. Die Immunisierung erfolgte nach folgendem Schema:

- Grundimmunisierung: 1×10^6 TNBS-modifizierte Zellen (2,4,6 Trinitrobenzensulfonsäure (Lemmonier et al., 1977; Stavrou et al., 1980) intraperitoneal (i.p.).
- Zweitimmunisierung nach 3 Wochen: 2×10^6 TNBS-modifizierte Zellen i.p.
- Boosterung 4 Monate nach Grundimmunisierung: 5×10^6 native Zellen i.p.

1.3.2 Milzzellen

Am 4. Tag nach dem Booster - zu dieser Zeit ist die Antigen-induzierte Proliferation der Plasmazellen am stärksten (Oi et al., 1978) - wurden die immunisierten Mäuse getötet, die Milz steril entnommen, mit dem Stempel einer 10 ml-Einmalspritze durch die Maschen eines 60 µm-Siebes gedrückt und in 10 ml DMEM/10 % FKS aufgenommen. Durch zweiminütiges Stehenlassen im Reagenzglas konnten die Milzzellen im Überstand von den inzwischen

sedimentierten gröberen Gewebebrocken durch Absaugen getrennt werden. Die Milzzellen wurden 10 min bei 1000 g zentrifugiert, das Pellet in 5 ml DMEM/10 % FKS resuspendiert und die Zellen im Coulter Counter gezählt (je Milz ca. 2×10^8 Zellen).

1.3.3 Serumgewinnung

Sofort nach der Tötung der Maus wurde noch vor der Entfernung der Milz der Brustkorb eröffnet und das Herz punktiert. So konnten jeweils ca. 0,5 bis 1,0 ml Blut gewonnen werden. Das daraus erhaltene Serum wurde später als Positivkontrolle verwendet.

1.3.4 Myelomzellen

Die für die Fusionen verwendete nicht-produzierende BALB/c-Mäusemyelomzelllinie X63-Ag8.653 (Kearney et al., 1979) wurde in 260 ml Plastikflaschen mit DMEM/20 % FKS im offenen System in einer 5 %igen CO_2 -Atmosphäre bei 37 °C und mit 95 % Luftfeuchtigkeit gezüchtet. 24 Stunden vor der Fusion wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 gesplittet, womit erreicht wurde, daß sich die Myelomzellkultur am nächsten Tag in der optimalen logarithmischen Wachstumsphase befand. Am Tage der Fusion wurden die Myelomzellen gewonnen und im Coulter Counter gezählt.

1.3.5 Zellfusionen

Die Fusionen wurden in Anlehnung an die Arbeiten von Davidson et al. (1976), Galfré et al. (1977) und Faze-kas de St.Groth et al. (1980) durchgeführt.

Die Milzzellen der immunisierten Mäuse wurden mit Mye-lomzellen der Linie X63-Ag8.653 im Verhältnis 10:1 ver-mischt, 5 min lang bei 800 g zentrifugiert, danach der Überstand über dem Zellpellet abgesaugt. Unter leichtem Schütteln wurde 1 ml des fusionsvermittelnden PEG (Po-lyäthylenglycoll, MG 4000, Merck, Darmstadt, 9727) in etwa 1 min zu dem Pellet gegeben und leicht suspen-dierte. Nach einer weiteren Minute wurde in 2 min 1 ml des Fusionsmediums bei leichtem Schütteln zu der Sus-pension zugegeben, in weiteren 3 min 2 ml des Fusions-mediums. Das Fusionsmedium bestand aus 450 ml DMEM + 50 ml NCTC 135 (Gibco, 041-1350) + 10 ml Na-Pyruvat (Gib-co, 043-1360) + 1,75 ml Aqua Versene. Daraufhin wurden während 5 min 4 ml HAT-Selektionsmedium (Littlefield, 1964) zugetropft (350 ml DMEM + 50 ml NCTC 135 + 100 ml FKS + 5 ml Na-Pyruvat + 1 ml Bykomycin + 5 ml HT (Hypo-xanthin/Thymidinlösung, Sigma) + 5 ml Aminopterin (Sig-ma) + 50000 I.E. Penicillin + 50 mg Streptomycin + 5 ml 8,8 %ige NaHCO_3).

In den folgenden 15 min erfolgte eine Inkubation im of-fenen System bei 37 °C, gefolgt von einer 10-minütigen Zentrifugation der Zellsuspension bei 800 g. Die Zellen wurden in 120 ml HAT-Medium schonend resuspendiert und auf vier 96-Mikrotiterplatten (Flow Lab., 72-176-05) ausgesät, wobei in die erste Reihe jeder Mikrotiter-platte nur Myelomzellen pipettiert wurden (HAT-Wir-kungskontrolle). Die vier Mikrotiterplatten waren am Tage vor der Fusion mit 2×10^4 Mäuseperitonealzellen pro Napf als feeder-layer (Hengartner et al., 1978; Su-gasawara et al., 1985) belegt worden.

Die Platten wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet und 3 Tage lang nicht bewegt. Am 4. Tag nach der Fusionierung konnte bereits in den meisten Näpfchen Koloniebildung beobachtet werden. Alle 3 Tage wurden zwei Drittel des HAT-Mediums über den Zellen abgesaugt und durch frisches HAT-Medium ersetzt. Nachdem nach 9 Tagen sämtliche Myelomzellen in der Kontrollreihe abgestorben waren, wurde das HAT-Medium durch HT-Medium (ohne Aminopterin), nach weiteren 5 Tagen durch normales HCM-Medium ersetzt. Das HCM-Medium setzte sich zusammen aus 700 ml DMEM, 100 ml NCTC 135-Medium und 200 ml FKS; pro Liter dieses Mediums werden 3,7 g NaHCO₃, 5 ml MEM Na-Pyruvat, 100.000 I.E. Penicillin G, 0,1 g Streptomycin und 0,1 g Neomycin zugesetzt. Alle 3 bis 4 Tage wurden die Hybridomzellen umgesetzt, die ersten 6 Monate mit, später dann ohne feeder-layer (Mäuseperitonealzellen).

1.3.6 Nachweis gliombindender Antikörper

10 Tage nach der Fusionierung wurden die Hybridomüberstände auf ihren Gehalt an Antikörpern getestet. Dies wurde parallel mit zwei verschiedenen Techniken durchgeführt:

1.3.6.1 Indirekte Immunperoxidasefärbung

Diese Methode der färberischen Darstellung von Antigen-Antikörper Reaktionen wurde nach Angaben von Pateraki et al. (1981) auf 60-Loch Terasaki-Platten (Nunc^R, 1-63118) durchgeführt:

Je 500 der Tumor-Targetzellen wurden in DMEM/10 % FKS pro Vertiefung einer Terasaki-Platte ausgesät. 20 min

später - die Zellen haben sich inzwischen am Boden der Löcher abgesetzt - wurden die Zellen mit 5 ml DMEM/10 % FKS überschichtet und im offenen System bei 37 °C bebrütet. Nach ca. 24 Stunden wurden die subkonfluenten Zellen zweimal mit PBS-A gewaschen, 20 min mit 0,5 % Glutaraldehyd in PBS-A fixiert, erneut dreimal mit PBS-A gewaschen und zur Reduzierung von unspezifischen Antikörperbindungen 10 min mit 10 %igem Schweineserum in PBS-A bei Raumtemperatur präinkubiert. Die nicht sofort gebrauchten Platten wurden mit dem Schweineserum bei - 20 °C eingefroren, bei den anderen Platten wurde das Schweineserum abgegossen und durch 'flicking off' (Abschlagen) weitestgehend entfernt.

Jeweils 20 µl der Hybridomüberstände wurden unverdünnt in eine Vertiefung der Terasaki-Platte gegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Als positive Färbekontrolle diente 1:1000 verdünntes Serum der zur Fusion verwendeten Mäuse, als negative Kontrolle Überstand von X53-Ag8.653-Myelomzellen. Anschließend wurde dreimal mit PBS-A/5 % FKS gewaschen. Als zweiter Antikörper wurden je Loch 20 µl eines 1:100 mit PBS-A/5 % FKS verdünnten Meerrettichperoxidase-konjugierten Kaninchen-Ig-anti-Maus-Ig (Dakopatts, Hamburg, P 260) auf die Zellen gegeben und ebenfalls bei 37 °C 30 min bebrütet. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS-A wurden die Antigen-Antikörper-Bindungsstellen durch Zugabe von 20 µl Substrat nach Nexø (1977) pro Loch sichtbar gemacht: 20 mg 3-amino-9-äthyl-carbazol (Sigma, Deisenhofen, A 5754) in 5 ml NN'-Dimethylformamid (Merck, 3034) gelöst, werden mit 95 ml 50 mM Acetatpuffer, pH 5,0, verdünnt, filtriert und unmittelbar vor Gebrauch mit 50 µl 30 %iger H_2O_2 -Lösung versetzt.

Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Substratreaktion durch dreimaliges Waschen mit PBS-A gestoppt und die Färbung im Durchlicht-Mikroskop (Zeiss ICM 405) ausgewertet, wobei folgende Intensitätsgrade der Rotfärbung unterschieden wurden:

+++ sehr stark positive, ++ stark positive, + schwach positive, - negative Reaktion.

1.3.6.2 Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Mit der Methode des micro - ELISA nach Posner et al. (1982) wurde die Bindungsreaktivität der Antikörper im Hybridomüberstand quantitativ erfaßt.

Je 1×10^4 der Targetzellen wurden in 200 µl DMEM/10 % FKS pro Loch einer 96-Mikrotiterplatte ausgesät und im offenen System bei 37 °C unter Zusatz von 5 % CO₂ bebrütet. Nach etwa 48 Stunden bildeten die Zellen einen subkonfluenten Monolayer auf dem Boden der Plattennäpfchen. Durch zweimaliges Waschen mit PBS-A wurden das Medium und Zelltrümmer aus den Platten entfernt, worauf die Zellen in 0,5 %iger Glutaraldehyd/PBS-A-Lösung 20 min bei Raumtemperatur fixiert wurden. Nach darauffolgender Auswaschung des Fixativs mit PBS-A wurden die Zellen mit 10 %igem Schweineserum in PBS-A 30 min bei Raumtemperatur präinkubiert, um nichtspezifische Antikörperbindungsstellen abzusättigen. Auch diese 'ELISA-Platten' wurden mit dem Schweineserum bei -20 °C für den späteren Gebrauch konserviert. Nachdem anschließend die Zellen in den Platten einmal mit PBS-A gewaschen wurden, wurden je Loch 50 µl unverdünnter Hybridomüberstand als 1. Antikörper zugegeben. Auch hier wurden als Kontrollen 1:1000 verdünntes Serum der mit den Targetzellen immunisierten Mäuse bzw. Myelomzellüberstand

verwendet. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen dreimal mit PBS-A/2 % FKS und dreimal mit PBS-A ohne FKS gewaschen. Danach wurden je Loch 50 µl des 2. Antikörpers, einem 1:100 mit PBS-A/2 % FKS verdünnten Meerrettichperoxidase-gekoppelten Kaninchen-Ig-anti-Maus-Ig zugegeben und wiederum 30 min lang bei Raumtemperatur bebrütet. Als Substrat wurden nach erneutem 5-maligen Waschen mit PBS-A pro Loch 100 µl eines Gemisches aus 10 mg ortho-Phenyldiamin (Sigma, P 3888) und 10 ml 0,1 M Citratpuffer, dem kurz vor Gebrauch 40 µl einer 3 %igen H_2O_2 -Lösung zugesetzt wurden, zugegeben, dessen Farbintensität nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Photometer (Titertek Multiscan^R MC, Flow Lab.) ausgewertet wurde. Als Leerwert dienten Löcher, deren Zellen nur mit Substratlösung inkubiert worden waren. Überstände wurden als positiv angesehen, wenn sie Extinktionen von mindestens dem Dreifachen des durchschnittlichen Leerwertes, also ungefähr 0,100 erreichten.

1.3.7 Hybridomselektion

Mittels der indirekten Immunperoxidasefärbung wurden die Antikörper produzierenden Hybridomklone sowohl gegen die zur Immunisierung verwendete Gliomzelllinie, als auch gegen Meningomzellen und normale Hundezellen getestet. Zu diesem Zweck wurden Meningomzellen, Gehirnzellen, Nierenzellen und Fibroblasten neonataler Boxer- und Dalmatinerhundewelpen auf Terasaki-Platten ausgesät, 48 Stunden bei 37 °C in DMEM/10 % FKS bebrütet und 20 min mit 0,5 %iger Glutaraldehydlösung fixiert. Die Färbung selbst wurde wie unter 1.3.6.1 beschrieben durchgeführt.

Nur solche Klone, deren Antikörper mit glialen Tumorzellen, nicht aber, bsp. nur gering, mit Meningeom- oder 'normalen' Zellen reagierten, wurden weitergezüchtet.

1.3.8 Hybridomaklonierung

Um monoklonale Antikörper zu erhalten, wurden die Antikörperproduzierenden Hybridzellen kloniert: ELISA- und IPF- positive Hybridzellen wurden in HCM suspendiert, in Coulter Counter gezählt und in einer Menge von etwa 500 Zellen pro Vertiefung in die erste Reihe einer 96-Mikratiterplatte mit Mausperitonealzellen als feeder layer ausgesät. Durch reinenweises Überpipettieren von jeweils der Hälfte des zellhaltigen Mediums in den Löchern wurde eine Verdünnungsreihe angelegt, bei der rechnerisch in die 10. Reihe jeweils eine Hybridzelle pro Loch gelangen sollte. Diese Klonierungsplatten wurden solange bebrütet, bis in den hinteren Reihen der Platten einzelne Hybridklone etwa 50 % der Bodenfläche der Vertiefung ausfüllten. Das dauerte durchschnittlich 8 bis 12 Tage, wobei nach vier Tagen zwei Drittel des alten Mediums gegen frisches ausgetauscht wurden. Die Überstände der Vertiefungen mit einem Klon wurden im micro-ELISA getestet, und die Hybridome der am stärksten positiven Löcher weitergezüchtet. Dieser Klonierungsvorgang wurde alle 6 bis 8 Wochen wiederholt, um eine stabile Antikörperproduktion zu gewährleisten.

1.3.9 Absorptionsversuche

Für quantitative Absorptionsversuche wurden in die Löcher einer 24-Linbroplatte (Nunc 1-43982) steigende Zahlen (1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6) von Targetzellen pipettiert, jeweils 5 μ l Hybridomüberstand in 200 μ l PBS-A zugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Linbroplatte 10 min lang bei 2000 g zentrifugiert und der Überstand mit dem micro-ELISA-Verfahren auf seinen Gehalt an verbliebenem freien Antikörper untersucht.

1.3.10 Hybridomkonservierung

Um ein Reservoir an antikörperproduzierenden Hybridomen zu erhalten, wurden diese vermehrt und nach zwei Methoden eingefroren:

a) Methode nach Ashwood-Smith (1961)

Die Hybridomzellen wurden in 260 ml-Plastikflaschen vermehrt, nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase suspendiert, 10 min bei 700 g zentrifugiert und jeweils 1×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, das aus HCM mit 50 % FKS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Serva, Heidelberg, 20385) bestand. Diese 1 ml Portionen wurden in sterile Plastik-Kryo-Tubes gefüllt, 4 Stunden bei 4 °C gekühlt und dann bei -90 °C tiefgefroren.

Aufgetaut wurden die Zellen bei 37 °C in einem Wasserbad. Danach wurde das Einfriermedium mit der ca. dreifachen Menge HCM verdünnt, die Zellen bei 700 g 10 min zentrifugiert, in HCM resuspendiert und auf Linbroplatten mit feeder layer ausgesät.

b) Methode nach Wells und Price (1983)

Die Hybridomzellen wurden in Linbroplatten vermehrt, bis sie am Einfriertag etwa 60 bis 80 % des Napfbodens bedeckten. Am Tag vor dem Einfrieren wurde das Medium gewechselt. Zum Einfrieren wurde das Medium abgesaugt und eisgekühltes Einfriermedium (800 µl pro Napf), bestehend aus 90 % Serum und 10 % DMSO, zugegeben. Nachdem die Platte mit Klebeband fest verschlossen worden war, wurde sie bei - 90 °C tiefgefroren.

Zum Auftauen wurde das Klebeband entfernt und die Platte in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt. Danach wurden die Näpfe mit ca. 2 ml 42 °C warmem Medium aufgefüllt. Dadurch taute in ca. 5 min das Einfriermedium auf, worauf zwei Drittel des Mediums wieder abgesaugt und durch Neues ersetzt wurden. Um DMSO zu entfernen wurden auch davon wieder zwei Drittel abgesaugt und durch frisches HCM ersetzt.

1.3.11 Kreuzreaktionen mit anderen Tumorzelllinien

Zur Ermittlung des Reaktionsspektrums der selektierten monoklonalen Antikörper wurden diese mit der indirekten Immunperoxidasefärbung gegen in vitro kultivierte Tumorzellen verschiedener Spezies getestet:

- 85DG-Mg-423 (Meningom, Hund)
- 85DG-Mg-478 (Meningom, Hund)
- 85DG-M-2635 (Malignes Melanom, Hund)
- 85H-M-2013 (Malignes Melanom, Mensch)
- B-16 (Melanom, Maus)
- 85MP-M-1191 (Melanom, Mini-Pig)
- 85MP-M-198 (Melanom, Mini-Pig)
- 85MP-M-196 (Melanom, Mini-Pig)
- 79FR-G-41 (Experimentelles Gliom, Ratte)

Als positive Färbekontrolle dienten die zur Immunisierung verwendeten Gliomzellen.

1.3.12 Anreicherung von Immunglobulinen mittels Ammoniumsulfatpräzipitation

Für die ADCC-Versuche wurden durch Ammoniumsulfatpräzipitation gewonnene Antikörper aus serumfreiem Hybridomüberstand verwendet.

Serumfreie Hybridomüberstände wurden tropfenweise mit gleichen Mengen eisgekühlter, gesättigter Ammoniumsulfatlösung (1000 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ad 1000 ml Aqua dest., mit 30 %iger NaOH auf pH 7,0 eingestellt) versetzt und 30 min bei 4 °C und fortgesetztem Rühren inkubiert (Jonak, 1980). Nach anschließender Ultrazentrifugation bei 48000 g und 4 °C wurde der klare Überstand abgesaugt und das Präzipitat in 40 %iger Ammoniumsulfatlösung aufgenommen, wieder wie oben inkubiert und zentrifugiert. Dieses Präzipitat wurde schließlich in einer kleinen Menge PBS-A resuspendiert, in Dialyseschläuche überführt und 36 Stunden gegen das 1000fache Volumen von PBS-A (pH 7,3) dialysiert.

1.3.13 Bestimmung des Immunglobulingehaltes

Der Immunglobulingehalt konzentrierter Antikörperlösungen wurde durch Messung der Absorption in einem Photometer (Zeiss MQ 3) bei einer Wellenlänge von 280 nm nach folgender Formel bestimmt (Goding, 1983):

$$\text{Ig (mg/ml)} = (A_{280}) : 1,4$$

1.3.14 Gewinnung von serumfreien Hybridomüberständen

Das normale Hybridomwachstumsmedium über subkonfluenten Hybridomkulturen wurde abgesaugt und durch serumfreies Hybridomerhaltungsmedium (FEB 100 Medium, Seromed, F 8015) ersetzt. In diesem Medium überlebten die Zellen bei erhaltener Antikörperproduktion noch etwa sechs bis acht Tage. Dieses Medium wurde gesammelt und 10 min bei 2000 g zentrifugiert.

1.3.15 Bestimmung von Immunglobulinklassen und -isotypen

Die Bestimmung der Immunglobulinisotypen erfolgte mit zwei Methoden:

a) Agargel-Immunodiffusion nach Ouchterlony (1962)

In das zentrale Loch einer Immunodiffusionsplatte (Miles Scientific, Naperville, USA, 642761) wurden je 20 µl der zur bestimmenden, zehnfach konzentrierten Hybridomüberstände gegeben. Die peripheren Löcher wurden mit Kaninchen-anti-Maus-IgG1, -IgG2a, -IgG2b, -IgG3, -IgM und -IgA (Miles, Yeda) beschickt und nach ca. 60 min noch einmal mit diesen Antiseren aufgefüllt. Nach ca. 48 Stunden Inkubation in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur waren Präzipitationslinien zwischen dem zentralen Loch und dem entsprechenden Antiserum-Loch zu erkennen.

b) ELISA-Verfahren mit Mouse Typer Sub-Isotyping Kit

Bei diesem Test wurde der Mouse Typer Sub-Isotyping Kit von BIO-RAD (172-2051) verwendet.

Zielzellen wurden in 96-Mikrotiterplatten ausgesät und

fixiert. Als 1. Antikörper wurde serumfreier Überstand der verschiedenen Hybridomklone verwendet (100 µl/Loch), welcher 30 min bei 37 °C inkubiert wurde. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-A/0,1 % Tween 20 (Merck, 822184) wurden 100 µl Kaninchen-anti-Maus-IgG1 bzw. -IgG2a, -IgG2b, -IgG3, -IgM oder IgA in die Löcher pipettiert, wiederum 30 min bei 37 °C inkubiert und dreimal mit PBS-A/Tween gewaschen. Sodann wurden die Löcher mit 100 µl Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Ziegen-anti-Kaninchen-Ig beschickt, 30 min bei 37 °C inkubiert, dreimal gewaschen und mit 100 µl des im Kit enthaltenen Substrates gefüllt.

1.4 Koppelung von Biotin an monoklonale Antikörper

Für direkte Färbungen ohne zweiten Antikörper und für den färberischen Nachweis der Koppelung von monoklonalen Antikörpern an Effektorzellen wurde der monoklonale Antikörper 10BD3 mit Biotin nach der bei Heggeness und Ash (1977) beschriebenen Methode gekoppelt:

0,5 ml einer 10BD3-Fraktion (3,3 mg/ml) in PBK wurden mit 0,1 ml einer 0,2 M NaHCO_3 in 0,15 M KCl (pH 8,8) bei Raumtemperatur vermischt. Dann wurden 5 µl einer Lösung von 6 mg/ml N-Hydroxy-Succinimidbiotin (Sigma, St. Louis, USA, H-1759) in Dimethylformamid unter vorsichtigem Vermischen bei Raumtemperatur dazugegeben. Nach 10 min Inkubationszeit wurde durch Hinzufügen von 50 µl einer 1 M Ammoniumchloridlösung die Reaktion gestoppt, die Lösung in einen Dialyseschlauch gegeben und drei Tage lang gegen PBK dialysiert.

1.5 Lichtmikroskopische Darstellung der Antikörperbindung

1.5.1 Zellkulturen

Mit der indirekten Immunperoxidasefärbung wurde die Antikörperbindung an Tumorzellen wie folgt dargestellt:

- 1000 Tumorzellen wurden in 0,5 ml DMEM-Medium pro Loch eines 8-fach gekammerten Objektträgers (Lab Tek^R Miles, 4808) verbracht
- Inkubation 24 Std. bei 37 °C
- 20 min Fixation mit 0,5 % Glutaraldehyd
- 3 x Waschen in PBS-A
- 20 %iges Kaninchen-Normalserum 30 min bei Raumtemperatur (RT)
- Je 200 µl Hybridomüberstand als 1. Antikörper pro Kammer, 30 min bei 37 °C
- 3 x Waschen in PBS-A
- 200 µl 1:100 mit PBS-A/2 % FKS verdünntes Meerrettichperoxidase-konjugiertes Kaninchen-Ig-anti-Maus-Ig (Dakopatts, Hamburg) pro Kammer, 30 min bei 37° C
- 3 x Waschen in PBS-A
- Sichtbarmachen der Antikörperbindung durch Zugabe von 200 µl Substrat nach Nexø (1977), 10 min bei RT
- 3 x Waschen in Wasser

Auswertung und Dokumentation erfolgten mit einem inversen Kameramikroskop (Zeiss ICM 405).

1.5.2 Gewebeschnitte

Die Darstellung der Bindung monoklonaler Antikörper an die Antigene der Tumorzellen von Paraffin-eingebetteten bzw. Kryostat-Schnitten (Gefriermikrotom Cryo-Cut von American Optical Corporation) erfolgte sowohl durch die PAP-Technik (Sternberger, 1969) als auch durch die Avidin-Biotin-Methode (Hsu et al., 1981).

1.5.2.1. Paraffinschnitte

a) PAP-Technik

- Erwärmung der Schnitte zur Verflüssigung des Paraffins 20 min bei 60 °C bzw. bei 40 °C (für niederschmelzendes Paraffin)
- 2 x 5 min Entparaffinierung in Xylol
- Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (je 5 min in 100 %, 96 %, 70 %, 50 % Alkohol)
- 2 min in PBS-A
- 5 min 3 %iges H_2O_2 zur Blockade der endog. Peroxidase
- 5 min Waschen mit PBS-A
- Kaninchen-Normalserum 1:10, 30 min bei RT
- Hybridomüberstände als 1. Ak über Nacht bei 4 °C
- 3 x 5 min Waschen
- Kaninchen-anti-Maus-Ig 1:50, 2 Std bei RT
- 3 x 5 min Waschen
- Monoklonaler Maus-PAP-Komplex (Dakopatts, P 650) 1:100, 60 min bei 37 °C
- 3 x 5 min Waschen
- Substrat nach Nexø, 15 min bei RT
- Stop der Reaktion in Aqua dest.
- Kerngegenfärbung mit Meyer's Hämalaun, 3 min
- Eindeckeln mit Kaiser's Glyceringelatine

b) Avidin-Biotin-Methode

Verwendet wurde ein Testkit (Vectastain ABC-Kit, Vector Lab. Inc., Burlingame, GB, SK 5100) bei folgender Vorgehensweise:

- Erwärmung, Entparaaffinierung und Rehydrierung wie bei der PAP-Technik (s. oben)
- Pferde-Normalserum 1:100, 20 min bei RT
- Hybridomüberstände, 30 min bei 37 °C
- 3 x 5 min Waschen
- Biotinyliertes Pferde-anti-Maus-IgG, 30 min bei 37 °C
- 3 x 5 min Waschen
- Mit alkalischer Phosphatase konjugierter Avidin-Biotin-Komplex, 30 min bei 37 °C
- 3 x 5 min waschen
- Substrat für alkalische Phosphatase, 20 min bei RT
- Stop der Reaktion in Aqua dest.
- Kerngegenfärbung wie bei PAP (s. oben)

1.5.2.2 Kryostatschnitte

a) PAP-Methode

- 20 min 100 ml Methanol + 25 ml 3 %iges H_2O_2 bei RT zur Blockierung der endogenen Peroxidase
- 2 x 5 min Waschen
- Kaninchen-Normalserum, 1:10, 60 min bei RT
- Hybridomüberstände, 2 Std. bei RT
- 3 x 5 min Waschen
- Weiter wie bei der PAP-Technik Paraaffinschnitt (s. oben)

b) ABC-Methode

- wie bei Paraffinschnitte ab Pferde-Normalserum (s. oben)

1.6 Elektronenmikroskopische Darstellung der Antikörperbindung

1.6.1. Zellkulturen

Die elektronenmikroskopische Darstellung der Antikörperbindung an Antigene der Tumorzellen erfolgte nach dem sog. Preembedding-Verfahren (immunochemische Färbung vor der Einbettung des Tumormaterials).

Als Färbemethode wurde die indirekte Immunperoxidase-methode unter Verwendung von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Serva, 18865) als Substrat (Graham und Karnovsky, 1966) gewählt. Die Inkubationen erfolgten durch Suspendierung der Zellen im jeweiligen Medium und wurden durch dreimalige Waschungen mit PBS-A (Zentrifugation 5 min bei 800 g) beendet.

- 5×10^6 Tumorzellen als Einzelzellsuspension im Aggl.
- Fixation der Tumorzellen 20 min mit 0,5 %igem Glutaraldehyd
- 3 x Waschen in PBS-A
- 1 ml Hybridomüberstand als 1. Ak, 30 min bei 37 °C
- 3 x Waschen in PBS-A
- 1 ml 1:100 mit PBS-A/2 % FKS verdünntes PO-K-anti-Ms-Ig, 60 min bei RT
- 3 x Waschen in PBS-A
- 1 ml DAB-Substrat (0,06 % DAB in 0,05 M Tris-Puffer, pH 7,6 + 0,01 % H_2O_2 ; vor Gebrauch filtriert), 10 min bei RT

- Stop der Reaktion durch 3 x Waschen
- Zentrifugation 10 min bei 1100 g,
- Nachfixation des Zellpellets in einer 2 %igen Osmiumtetroxid/Sörensenpuffer-Lösung, pH 7,6, 20 min bei RT
- Dehydration des Pellet in einer aufsteigenden Acetonreihe
- Einbettung in Epon^R
- Anfertigung von 70 bis 120 nm dicken Ultradünnschnitten, auf Nickelnetzchen montiert

Die Auswertung und Dokumentation erfolgte in einem Zeiss EM 10 - Transmissionselektronenmikroskop bei 60 kV.

1.7 Gewinnung von Effektorzellen

1.7.1 Thioglycollate-stimulierte Peritoneal-Makrophagen

BALB/c-Mäuse erhielten 1,5 ml Thioglycollate-Medium (10 %ig, in kochendem Wasser gelöst, anschließend autoklaviert, Difco Lab., Detroit, USA, 0256-01-0) intraperitoneal injiziert. 4 Tage später wurden die Tiere durch Genickdislokation getötet, die Bauchhaut nach einem Einschnitt in die Kniefalte abgezogen und die Peritoneal-Exsudat-Zellen durch Lavage der Peritonealhöhle mit PBS-A/2 % FKS, welchem 10 Einheiten Heparin pro ml zugesetzt wurden, mittels 10 ml - Spritze und weitlumiger Kanüle (0,9 x 35 mm) gewonnen (McCarron et al., 1984).

Die Spülflüssigkeiten von 2 bis 4 Mäusen wurden in einem eisgekühlten Zentrifugenröhrchen gepoolt und bei 4 °C 10 min lang mit 400 g zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 4 ml DMEM/20 % FKS suspendiert

und in eine Petrischale, welche 30 min bei 37°C und 5 % CO₂ mit 5 ml DMEM/20 % FKS inkubiert worden war, gegeben und 1 Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet.

Nach dieser Inkubation wurden die nichtadhärenten Zellen durch wiederholte Spülungen mit kaltem PBS-A unter leichtem Schütteln der Schale abgesaugt. Daraufhin wurde die Petrischale mit 3 ml vorgewärmter, 1 : 5000 mit PBS-A verdünnter Versenelösung gefüllt. Nach 15 min Inkubation bei 37 °C wurden durch kräftiges Pipettieren über die Plattenbodenoberfläche die adhärenen Zellen abgelöst. Eventuell verbliebene Zellen wurden mit dem Policeman-rubber und Versenelösung entfernt (Mosier, 1984).

Von den so gewonnenen plastikadhärenen Zellen waren durchschnittlich 90 bis 95 % zur Phagozytose fähig (bestimmt durch Phagozytose von Tusche-partikeln und Auszählung in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer).

1.7.2 T-Lymphozyten

Zwei bis vier Wochen alten BALB/c-Mäusen wurden nach Genickdislokation Thymus und Milz entnommen. Diese Organe wurden mit Skalpellklingen kleingeschnitten, durch ein Sieb mit der Maschenweite 60 µm gedrückt und in DMEM/20 % FKS (18 ml pro Maus) aufgenommen. Anschließend wurde die Suspension zur Entfernung größerer Gewebefetzen durch eine dreifache Mullage filtriert, in 10 ml-Zentrifugenröhrchen auf Ficoll-Hypaque-Gradienten (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, New Jersey, 11-0-004-03) mit der Dichte 1,077 g/ml gelegt (6 ml Suspension auf 3 ml Gradienten) und 30 min bei 400 g und 20 °C zentrifugiert (Boyum, 1968; Harris und Ukaejiofo, 1970). Diejenigen Lymphozyten, die sich nach der

Zentrifugation auf dem 1,077 g/ml-Gradienten abgelagert hatten, wurden zweimal in kaltem PBS-A gewaschen, in DMEM/20 % FKS aufgenommen und zur Entfernung der plastikadhärenten Zellen 45 min bei 37 °C in Plastikgewebekulturflaschen inkubiert.

Die so gewonnenen nichtadhärenten Zellen enthielten durchschnittlich 96 % Lymphozyten mit einer Vitalität von über 90 % (Trypan-Blau Test).

Zur Trennung von B- und T-Lymphozyten (Wysocki und Sato, 1978) wurden Plastikgewebekulturflaschen mit 3 ml eines 1 : 50 in 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 9,5) verdünnten Anti-Maus-IgG-Serum beschickt und 45 min lang bei Raumtemperatur an einem lichtgeschützten Ort inkubiert. Dann wurde der Überstand dekantiert, die Flasche dreimal mit kaltem PBS-A und einmal mit kaltem PBS-A/1 % FKS gewaschen und mit 10 ml der Lymphozytensuspension (2×10^6 /ml) gefüllt und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Daraufhin konnten die nichtadhärenten Zellen - überwiegend T-Lymphozyten - nach leichtem Schütteln der Flaschen abgegossen werden, die adhärenen B-Lymphozyten verblieben auf dem Boden der Flasche.

1.8 Licht- und elektronenmikroskopische Darstellung der ADCC

Mit dem monoklonalen Antikörper 6EB4 aus einer Fusion von Splenozyten einer mit 77DG-G-166 Gliomzellen immunisierten Maus mit Myelomzellen wurden verschiedene Versuchsansätze für die licht- und elektronenmikroskopische Darstellung der ADCC und ihres zeitlichen Verlaufes mit Mäuseperitonealmakrophagen als Effektorzellen durchgeführt (Tab. 1).

Die Inkubationen erfolgten dabei entweder in 80 cm²-Zellkulturflaschen mit den Tumorzellen als Monolayer, oder in Reagenzgläsern mit den Tumorzellen in Einzelsuspension (S). Bei jedem Ansatz betrug die Anzahl der Zielzellen etwa 2×10^6 .

Als Antikörper wurden 400 µl eines Hybridomüberstandes von 6EB4 verwendet, welcher im ELISA-Verfahren bei einer Verdünnung von 1:200 eine Extinktion von 0,520 zeigte und in der indirekten Immunperoxidasefärbung in derselben Verdünnung noch eine sehr starke Markierung (+++) der Tumorzellen hervorrief.

Als Effektorzellen wurden für jeden Ansatz 20×10^6 Thio-glycollate-stimulierte Peritoneal-Makrophagen verwendet.

Zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils dreimal mit PBS-A gewaschen. Die Inkubationen wurden bei 37 °C ausgeführt.

Nach Beendigung der letzten Inkubation wurden die Tumorzellen mit einer 0,5 %igen Glutaraldehydlösung fixiert und im Preembedding-Verfahren weiter mit der indirekten Immunperoxidasemethode gefärbt:

- 3 x Waschen
- 1:100 mit PBS-A/5 % FKS verdünntes PO-K-anti-Ms-Ig,
60 min bei RT
- 3 x Waschen
- Färbung mit DAB-Substrat, 10 min bei RT
- 3 x Waschen

In der nun vorliegenden Form konnten die einzelnen Versuchsansätze unter dem Lichtmikroskop ausgewertet werden. Für die Betrachtung im Elektronenmikroskop wurden anschließend die Zellmonolayer mit dem Policeman-rubber von der Wuchsfläche abgerieben, in Reagenzgläser überführt und 10 min bei 1100 g zentrifugiert. Diese

Pellets wurden sodann nachfixiert, dehydriert, in Epon^R eingebettet und geschnitten (s. Kap. 1.6.1).

Versuch	Inkubation mit MAK	Inkubat. mit Effektorzellen
I	60 min	30 min
II	60 min	60 min
III	60 min	180 min
IV	60 min	24 Std
V	60 min	48 Std
VI (S)	Zugabe von Effektorz. + MAK gleichzeitig, 60 min	
VII	Frankieren der Effektorz. mit MAK 60 min, dann Inkubation mit Tumorzellen 60 min	

Tab. 1: Licht- und elektronenmikroskopische Darstellung der ADCC;
Inkubationszeiten.

MAK = monoklonaler Antikörper 6EB4

Effektorzellen = 20×10^6 Peritonealmakrophagen

1.9 Colony-Formation-Inhibition-Assay (CFIA)

Der Colony-Formation-Inhibition-Test nach Hellström (1967) und Hellström et al. (1969, 1971) wurde in Anlehnung an Herlyn und Koprowski (1982) in modifizierter Form durchgeführt.

Tumor-Target Zellen wurden durch Trypsinierung von der Wuchsfläche der Plastikkulturflaschen gewonnen, einmal gewaschen, pelletiert und auf 5×10^3 Zellen pro ml mit DMEM/10 % FKS resuspendiert. Dieses Medium wurde während des gesamten Versuches verwendet. Zur besseren Handhabung wurde der Kolonienbildungs - Hemmungstest nicht in Petrischalen oder Gewebekulturflaschen, sondern in 24-Linbroplatten durchgeführt.

In jedes Loch einer 24-Linbroplatte wurde 1 ml dieser Zellsuspension pipettiert und bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO₂ 24 Stunden lang bebrütet. Während dieser Zeit streckten sich die Zellen am Boden des Napfes aus und teilten sich einmal. Danach wurde das Medium über den Zellen abgesaugt und durch 1 ml eines Mediums ersetzt, das Effektorzellen und Antikörper enthielt. Kontrolllöcher enthielten nur Targetzellen, Targetzellen und Effektorzellen oder Targetzellen und monoklonale Antikörper.

Nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen wurden die Zellen in jedem Napf trypsiniert, in 1 ml einer 0,3 %igen Agar-Lösung in Medium suspendiert und 250 µl dieser Zell-Agar-Suspension in ein Loch einer weiteren 24-Linbroplatte überführt.

Nach 5 bis 7 Tagen Inkubation wurden die Kolonien unter einem Lichtmikroskop ausgezählt (10 Gesichtsfelder pro Loch). Da weder Makrophagen noch Lymphozyten Kolonien bilden, entspricht jede Kolonie einer lebenden und sich teilenden Targetzelle (Abb. 16d).

Mit der Zahl der Kolonien in den verschiedenen Versuchsansätzen konnte in Relation zu der Kolonienzahl in den Kontrolllöchern die zytotoxische Reaktivität der Effektorzellen quantifiziert und als cytotoxischer Index (I_C) nach Wood und Morton (1979) und Kornblith et al. (1974) berechnet werden:

$$I_C = 1 - \frac{\text{Anzahl der Kolonien im Testnapf}}{\text{Anzahl der Kolonien im Kontrollnapf}}$$

1.10 ADCC-Versuche in vivo

Versuche zur Tumorstumshemmung mit Effektorzellen, die mit monoklonalen Gliomantikörpern "frankiert" worden waren, wurden an Nacktmäusen (BALB/c-nu/nu) durchgeführt.

Untersucht wurde das Wachstumsverhalten der Transplantationstumoren der Linien 79FR-G-41, 77DG-G-166 und 83DG-G-422.

BALB/c-nu/nu-Mäusen wurden subkutane Transplantate inokuliert. Die Tiere wurden in vier Gruppen zu jeweils 5 bis 7 Mäusen aufgeteilt.

Die Tiere der Gruppe I wurden am zweiten und vierten Tag nach der Tumorinokulation mit jeweils 5×10^6 Effektorzellen und 0,2 mg monoklonalen Antikörpern intraperitoneal behandelt, Gruppe II nur mit 5×10^6 Effektorzellen, Gruppe III nur mit 0,2 mg Antikörper und Gruppe IV mit physiologischer Kochsalzlösung. Bei Gruppe I waren Effektorzellen und monoklonale Antikörper

vor der Injektion eine Stunde lang miteinander bei Raumtemperatur inkubiert worden.

Die Injektionsvolumina betrugen bei jeder Behandlung und jeder Gruppe 0,5 ml.

Mit beginnendem sichtbaren Tumorwachstum wurden in regelmäßigen Abständen von zwei Tagen mittels einer Schublehre die Tumoren vermessen und aus dem Produkt der drei Hauptdiameter das Tumolvolumen errechnet.

2 Ergebnisse

2.1 Zellkulturen

Die Zellkultur des Hundeglioms 77DG-G-166 besteht aus zumeist parallel zueinander angeordneten, homogenen, spindelförmigen-schlanken, langgestreckten Zellen mit zentral gelegenen, rundlichen Kernen. Die Zellen weisen meist mehrere Zellfortsätze auf, welche auch nach längerer Kultivationsdauer in ihrer typischen langen Ausbildung erhalten bleiben. Die mit immunochemischer PAP-Färbung nachgewiesene GFAP- und S-100- Expression ist auch nach langer Kultivationszeit noch vorhanden.

Im Gegensatz dazu zeigen sich bei der Kultur 83DG-G-422 sehr heterogene Zellformen. Es kommen schlanke, spindelförmige Zellen mit langgestreckten Fortsätzen neben etwas plumperen Zellen mit kurzen, dickeren, sich büschelartig aufzweigenden Ausläufern vor. Außerdem finden sich in der Kultur rundliche Zellen ohne Zellfortsätze. Im Laufe der Züchtung traten die langgestreckten Zellen mit weiten Ausläufern immer mehr in den Hintergrund, so daß etwa ab der 20. Passage das Aussehen der Zellpopulation von den kleineren, rundlicheren Zellen mit kurzen Fortsätzen bestimmt wurde. Die immunochemische Untersuchung auf Expression von GFAP und Protein S-100 verlief negativ.

Die 79FR-G-41 Zellen zeigen alle Eigenschaften von pleomorphen Astrozytom-Zellen. Sie sind meist schlank und protoplasmareich, mit langen, bei zunehmender Kultivationsdauer kürzer werdenden Fortsätzen versehen, und zeigen relativ häufig Mitosefiguren und Riesenzellbildung. Das Vorkommen von S-100- und GFA-Protein wurde nachgewiesen.

2.2 Transplantationstumoren

Die in Nacktmäusen durch subkutane Injektion von jeweils 2×10^6 Zellen der Gliomlinien 77DG-G-166, 83DG-G-422 und 79FR-G-41 zwischen die Schulterblätter erzeugten Transplantationstumoren (TT 166/77, TT 422/83, TT 41/79) erreichten nach durchschnittlich zwei Wochen etwa Kirschgröße; sie waren gut gegen das umgebende Unterhautgewebe abgegrenzt, grauweiß und von fester Konsistenz.

Histologisch zeigten alle drei Transplantationstumoren in Zytomorphologie und Aufbau deutliche Übereinstimmungen mit den Primärtumoren.

Der Transplantationstumor 166/77 hatte den typischen kleinzelligen, gut differenzierten, astrozytären Charakter des Primärtumors N 166/77 mit fortsatzreichen, eher kleinen Zellen mit rundlichen bis ovoiden Kernen. Bei dem TT 422/83 findet sich die Pleomorphie, der gekammerte Aufbau und das Vorkommen von zahlreichen Mitosen des Primärtumors N 422/83 wieder.

Regressive Veränderungen wie Nekrosen oder Verschleimungszonen fanden sich bei den zwei Wochen alten Transplantationstumoren kaum; sie traten erst bei größeren Tumoren nach 3 bis 4 Wochen auf.

Der etwas schneller wachsende Transplantationstumor der Zelllinie 79FR-G-41 zeigte dagegen bereits nach zwei Wochen deutliche Riesenzellbildungen und zahlreiche Herdnekrosen bei, im Gegensatz zum Primärtumor N 41/79, weniger deutlicher Pleomorphie.

2.3 Monoklonale Antikörper

2.3.1 Hybridome

Bereits der erste Fusionsversuch von Milzzellen einer BALB/c-Maus, die mit Gliomzellen der Linie 77DG-G-166 immunisiert wurde, mit Zellen der nicht Immunglobulin-produzierenden BALB/c-Mäusemyelomlinie X63-Ag8.653 war erfolgreich (F 166/77).

Am 9. Tage nach der Fusion wurden vier mit Fusionsprodukten beschickte 96-Mikrotiterplatten auf Hybridomwachstum untersucht. Von 352 Plattennäpfchen, in die Milz- und Myelomzellen ausgesät worden waren (32 Löcher waren nur mit Myelomzellen belegt worden), zeigte sich in 313 deutliche Bildung von einem oder mehreren Zellklonen. Das entspricht, wenn man pro Loch von einer gebildeten Hybridzelle ausgeht, bezogen auf die eingesezte Zahl von 2×10^7 Myelomzellen, einer Fusionsrate von 15,6 pro 10^6 Myelomzellen.

Am 11. Tag wurden die Überstände mittels micro-ELISA gegen 77DG-G-166 auf ihren Gehalt an Gliomantikörpern getestet. Dabei zeigten die Überstände von 148 Löchern positive Reaktionen, wobei 98 schwach positive Extinktionen zwischen 0,050 und 0,100, 37 Extinktionen zwischen 0,101 und 0,400 (positiv) und 13 Löcher mit Extinktionen über 0,400 stark positive Werte ergaben.

Am selben Tag wurden die 50 ELISA-positiven Überstände mit der indirekten Immunperoxidasefärbung auf Vorhandensein von Gliomantikörpern getestet, wobei wiederum die 13 stark positiven Überstände aus dem ELISA-Verfahren die Zielzellen am deutlichsten färbten (++ bis +++). Von den 37 anderen ELISA-positiven Überständen zeigten 30 schwache Reaktionen (+), 7 waren in diesem Verfahren negativ.

Die 43 positiven Hybridome wurden kloniert und die Überstände nach 10 Tagen Hybridomwachstum im micro-ELISA wiederum auf ihren Antikörpergehalt gegen 77DG-G-166 Zellen getestet. Bei 9 konnten keine positiven-Klone mehr isoliert werden.

Aus den 34 Gliomantikörper-positiven Klonen wurden die Überstände mit dem stärksten Antikörpergehalt auf Linbroplatten mit Peritonealmakrophagen als feeder-layer weitergezüchtet.

Nach einer Woche hatten sich die Zellen soweit vermehrt, daß die Überstände erneut auf den Antikörpergehalt gegenüber der Zielzelllinie getestet werden konnten. Gleichzeitig wurde die Reaktivität gegen canine fetale und adulte Hirnzellen, Fibroblasten und Nierenzellen getestet (Tab. 2). 14 dieser 34 getesteten Antikörper reagierten mit 77DG-G-166 Gliomzellen, nicht dagegen mit einer der anderen Zelllinien.

Für weitere Untersuchungen wurden vier Antikörper ausgesucht, die sehr stark mit der Gliomzelllinie 77DG-G-166 reagierten, aber keine Reaktion mit den getesteten nicht-blastomatisierten Zellen zeigten: 5CC3, 6EB4, 10BD3 und 11EC7. Diese vier Hybridomlinien wurden in kurzen Abständen zweimal kloniert, um nicht-produzierende Varianten auszuschließen.

Danach wurden die Hybridomlinien regelmäßig alle sechs bis acht Wochen rekloniert und eingefroren, um eine konstante Antikörperproduktion bis zum Ende der Untersuchungen aufrechterhalten zu können.

2.3.2 Allo gene und xenogene monoklonale Antikörper

Im Rahmen dieser Untersuchungen fanden die gegen die Hundegliomlinie 83DG-G-422 erzeugten Antikörper 17EC5, 22FF1, 32DF5 und 45HD2 Verwendung (Schmitt, 1986). Zu

Klon	77DG-G-166	Hirnzellen	Nierenzellen	Fibroblasten
1D07	++	-	-	-
1DH4	+	-	-	-
1FC7	+	-	-	+
2BH8	+	+	++	++
2CD2	+	-	-	-
3AH1	+	+	-	+
3DF4	+++	+	+	+
3FA2	+	+	-	-
4BB1	+	+	+	+
4HG7	+	-	-	-
5AD8	+	-	-	-
5CC3	+++	-	-	-
5GD7	+	+	+	+
6DG3	+	-	-	-
6EB4	+++	-	-	-
6HH2	+	-	-	-
7AH8	+	+	-	-
7CD1	+	+	++	+
7FF4	+	++	+	+
7HD5	++	+	-	-
8AC6	+	-	-	-
8BC4	+++	+	++	++
8GA8	++	++	-	+
9CB2	+	+	-	-
9CC3	++	-	-	-
9EB3	+	+	+	+
9HH7	+	+	+	+
10AH6	+++	+	-	-
10BD3	+++	-	-	-
10HC8	+	-	-	++
11CE6	+	-	+	+
11EC7	++	-	-	-
12BG6	+	-	-	-
12CA3	++	+	+	-

Tab. 2: Reaktivität monoklonaler Antikörper der F 166/77 mit Gliomzellen und normalen Hundezellen. Indirekte Immunperoxidasefärbung.

deren Reaktionsverhalten gegenüber Gliomzellen und normalen Hundezellen s. Tab. 3.

Außerdem kam der gegen die Rattengliomlinie produzierte monoklonale Antikörper 14AC1 zur Anwendung (Stavrou et al., 1982, 1983; Süß, 1983). Dieser Antikörper reagiert mit 79FR-G-41 Zellen sowie drei weiteren syngeneten Gliomlinien, nicht aber mit Hirn- und Nierenzellkulturen von Ratten.

Klon	83DG-G-422	Hirnzellen	Nierenzellen	Fibrobl.
17EC5	+++	+	-	-
22FF1	+++	-	-	-
32DF5	++	+	-	-
45HD2	+++	+	-	-

Tab. 3: Reaktivität monoklonaler Antikörper der F 422/83 mit Gliomzellen und normalen Hundezellen.
Indirekte Immunperoxidasefärbung.

2.3.3 Quantitative Absorption

Mit der Gliomzelllinie 77DG-G-166 und normalen Hirn- und Nierenzellen eines Hundes wurde ein Absorptionsversuch durchgeführt. Dabei wurde der Antikörper 6EB4 verwendet. Nach Beendigung der Inkubationen wurden die zellfrei zentrifugierten Überstände mit dem micro-ELISA

Verfahren auf ihren Gehalt an verbliebenem Antikörper getestet, wobei mit steigenden Gliomzell-Zahlen die Extinktion im ELISA geringer wurde, also mehr Antikörper gebunden wurde, je mehr Zielzellen vorhanden waren. Bei Inkubation von 6EB4 mit Hirn- und Nierenzellen kam es nur zu einem ganz geringen Abfall der Antikörperkonzentration im Überstand, was möglicherweise auf geringe unspezifische Bindung des Antikörpers an diese Zellen zurückzuführen ist (s. Abb. 1).

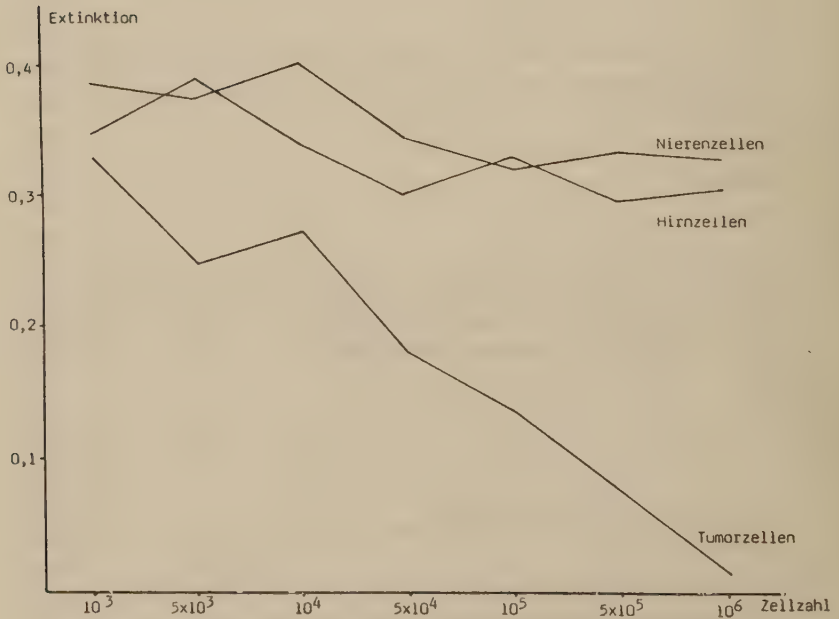


Abb. 1: Absorption des monoklonalen Antikörpers 6EB4 an Gliomzellen, Nierenzellen und Hirnzellen.

2.3.4 Kreuzreaktionen mit anderen Tumorzellen

Die monoklonalen Gliomantikörper wurden mit indirekten Immunperoxidasefärbungen auf ihre Reaktivität gegen andere Tumorzelllinien getestet:

85DG-Mg-423 (Meningom, Hund)
85DG-Mg-478 (Meningom, Hund)
85DG-M-2635 (Malignes Melanom, Hund)
85H-M-2013 (Malignes Melanom, Mensch)
B16 (Melanom, Maus)
85MP-M-198 (Melanom, Mini-Pig)
85MP-M-196 (Melanom, Mini-Pig)
85MP-M-1191 (Melanom, Mini-Pig)

Zusätzlich wurden die Antikörper auf Kreuzreaktionen zwischen den Tumorzelllinien 77DG-G-166, 83DG-G-422 und 79FR-G-41 getestet.

Die Hundemeningomzellen 85DG-Mg-423 wurden von keinem der getesteten Antikörper erkannt. Alle anderen untersuchten Tumorzelllinien zeigten Kreuzreaktionen, insbesondere die drei Gliomlinien und die Hundemelanomlinie (Tab. 4). Die höchste Spezifität gegenüber gliomassoziierten Antigenen zeigten in diesen Untersuchungen zwei Antikörper der F 166/77: 5CC3 und 11EC7. Das breiteste Reaktionsspektrum zeigten die Antikörper 45HD2 (F 422/83), 14AC1 (F 41/79) und 6EB4 (F 166/77).

Zelllinie	5CC3	6EB4	10BD3	11EC7	17EC5	22FF1	32DF5	45HD2	14AC1
77DG-G-166	+++	+++	+++	++	++	+	+	++	+
83DG-G-422	+	++	+	+	+++	++	++	+++	+
79FR-G-41	++	++	+	+	++	-	-	-	+++
85DG-Mg-423	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85DG-Mg-478	-	+	-	-	-	+	+	++	-
85DG-M-2635	-	+	+	-	+	-	++	+	+
85H-M-2013	-	-	-	-	-	+	+	++	+
B16	-	-	-	-	+	-	-	++	++
85MP-M-198	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85MP-M-596	-	+	-	-	-	-	-	+	-
85MP-M-1191	-	+	-	-	-	-	+	+++	+

Tab. 4: Kreuzreaktionen der monoklonalen Antikörper mit diversen Tumorzelllinien.
Indirekte Immunperoxidasefärbung.

2.3.5 Bestimmung von Immunglobulinklassen und -isotypen

Mit der Agargel-Immunodiffusions-Methode nach Ouchterlony (1962) und einem ELISA-Verfahren wurden die Gliomantikörper bestimmten Immunglobulinklassen und -subklassen zugeordnet (Tab. 5).

Klon	Ouchterlony	ELISA-Verfahren
5CC3	IgG2b	IgG2b
6EB4	IgG2b	IgG2b
10BD3	IgG1	IgG1
11EC7	-	IgG2b
17EC5	IgG2b	IgG2b und IgM
22FF1	IgG1	IgG1
32DF5	IgM	IgM
45HD2	IgM	IgM

Tab. 5: Immunglobulinklassen-Typisierung der verwendeten monoklonalen Antikörper mit den Methoden Agargel-Immudiffusion und ELISA-Verfahren.

Beide Methoden führten zu übereinstimmenden Ergebnissen. Beim 11EC7 konnte im Ouchterlony-Test keine eindeutige Bande identifiziert werden, beim 17EC5 zeigte das ELISA-Verfahren positive Reaktionen sowohl bei IgM (schwächer), als auch bei IgG2b (stärker).

Der Antikörper 14AC1 gehört zum Isotyp IgG2a (Mellert, 1984).

2.4 Immunochemische Darstellung der Antikörperbindung

2.4.1 Lichtmikroskopie

2.4.1.1 Gliomzellkulturen

Die Reaktion der Antikörper mit den zur Immunisierung verwendeten Gliomzellen wurde mit der indirekten Immunperoxidasefärbung auf gekammerten Objektträgern durchgeführt. Als Substrat wurde 3-amino-9-äthyl-carbazol (AEC) verwendet, das die Antigen-Antikörper-Reaktionsstellen deutlich rot markiert.

Die Antikörper der F 166/77, 5CC3, 6EB4, 10BD3 und 11EC7, reagierten homogen mit der gesamten Zelloberfläche der Zielzellen, wobei allerdings die Rotfärbung des AEC-Substrates als Reaktionsprodukt bei den monoklonalen Antikörpern 10BD3 und 11EC7 ein leicht körniges, aufgelockertes Aussehen hatte, während die beiden anderen Antikörper die Zelloberfläche durchgängig anfärbten. Stets waren auch die Zellfortsätze in die Farbreaktion mit einbezogen (Abb. 15a).

Dagegen reagierten die Antikörper der Linie 83DG-G-422 nur mit Teilen der 83DG-G-422 Zelloberfläche, die sich überdurchschnittlich häufig in Kernnähe und am Ursprung der Zellfortsätze befanden.

Der gegen die Linie 79FR-G-41 gerichtete Antikörper 14AC1 reagierte unterschiedlich mit den Targetzellen. Bei einem Teil der Rattengliomzellen wurde die gesamte Zellmembran einschließlich der Zellfortsätze angefärbt, während sich die Reaktionsprodukte bei anderen Zellen nur an einzelnen Stellen der Zelloberfläche fanden. Weniger als 10 % der Zellen reagierten nicht mit dem Antikörper.

2.4.1.2 Gewebeschnitte

Für die lichtmikroskopische Darstellung der Antikörperbindung in Primärgliomen und Transplantationstumoren wurden die Peroxidase-anti-Peroxidase- (PAP) und die Avidin-Biotin-Komplex- (ABC) Methode verwendet. Gefrierschnitte der Transplantationstumoren wurden nur mit dem PAP-Verfahren untersucht.

Die Darstellung monoklonaler Antikörper an Paraffinschnitten der Primärtumoren gelang bei N 166/77 nur mit 10BD3 und 11EC7 (Antikörper aus F 166/77), sowie mit 22FF1 und 45HD2 (Antikörper aus F 422/83). Dabei wurde ein Teil der Tumorzellen markiert, während die Zellen des umgebenden gesunden Hirngewebes nicht reagierten. Der Antikörper 45HD2 färbt mit geringerer Intensität vereinzelt gliale Zellen (Abb. 15c, 15d).

Der Primärtumor 422/83 konnte mit den Antikörpern 45HD2, 22FF1 und 10BD3 dargestellt werden, wobei die Reaktionsverteilung ähnlich wie bei 166/77 war. Der Antikörper 11EC7 reagierte nicht mit dem Primärtumor (Tab. 6).

An den Paraffinschnitten der Transplantationstumoren TT 166/77 und TT 422/83 wurden mit denselben Antikörpern fast alle Tumorzellen angefärbt. Darüberhinaus erkannten die Antikörper 11EC7 und 32DF5 Antigene des Transplantationstumors TT 422/83 (Tab. 6).

Eine Reaktion des monoklonalen Antikörpers 14AC1 (F 41/79) konnte sowohl an Paraffinschnitten des TT 166/77 als auch des TT 422/83 nachgewiesen werden, wobei die Färbung aber nur jeweils ca. 10 bis 20 % der Zellen betraf.

Mit dem paraffineingebetteten TT 41/79 reagierten die Antikörper 14AC1 (nahezu alle Zellen gefärbt), sowie 10BD3, 11EC7 und 22FF1 (wenige Zellen gefärbt) (Tab. 6).

Qualitative Unterschiede zwischen der PAP- und der ABC-Färbung ergaben sich nicht. Bei der ABC-Methode konnten aber mit wesentlich kürzeren Inkubationszeiten gleich gute Ergebnisse erzielt werden.

Bei den immunochemischen Färbungen der Kryostatschnitte der Transplantationstumoren TT 166/77 und TT 422/83 mit der PAP-Methode ergab sich, daß alle untersuchten, gegen die jeweilige Zelllinie gerichteten monoklonalen Antikörper mit den Tumorzellen reagierten, und zwar in viel stärkerem Ausmaß als bei den paraffineingebetteten Transplantationstumoren. Auch die Antikörper 5CC3, 6EB4 und 17EC5 zeigten bei den Kryostatschnitten Reaktionen mit einem Teil der Tumorzellen (Tab. 6).

Klon	N166/77	TT _{par} 166/77	TT _{kry} 166/77	N422/83	TT _{par} 422/83	TT _{kry} 422/83	TT _{par} 41/79
5CC3	-	-	+	-	-		-
6EB4	-	-	+	-	-		-
10BD3	+	++	+++	+	+		+
11EC7	+	++	+++	-	+		+
17EC5	-	-		-	-	+	-
22FF1	+	+		+	++	++	+
32DF5	-	-		-	++	+++	-
45HD2	+	++		+	++	+++	-
14AC1		+	++		+	++	+++

Tab. 6: Übersicht der immunochemischen Färbungen der Tumorgewebschnitte mit monoklonalen Antikörpern.

TT_{par} = paraffineingebetteter Transplantations-tumor

TT_{kry} = Kryostatchnitt des Transplantations-tumors

PAP- bzw. ABC-Färbung.

2.4.2 Elektronenmikroskopie

2.4.2.1 Gliomzellkulturen

Die elektronenmikroskopische Darstellung der Antikörperbindung an Oberflächenantigene von Gliomzellen wurde im Preembedding-Verfahren mit indirekter Immunperoxidasefärbung unter Verwendung von 3,3'-Diaminobenzidin als Substrat durchgeführt.

Nach Einbettung der gefärbten Zellen in Epon^R wurden die Ultradünnschnitte im Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss EM 10) ausgewertet. Die Bindungsstellen der monoklonalen Antikörper konnten als DAB-Niederschlag gut lokalisiert werden konnten.

Es bestätigten sich die lichtmikroskopischen Beobachtungen, daß alle 9 untersuchten Antikörper an Antigene auf der Zelloberflächenmembran binden, und daß die Antikörper der F 166/77 fast lückenlos mit der gesamten Zellmembran der 77DG-G-166 Zellen reagieren (Abb. 15b), während die Antikörper der F 422/83 und der Antikörper 14AC1 einzelne Abschnitte der Zelloberfläche der Targetzellen frei lassen.

2.5 Koppelung von Biotin-markierten monoklonalen Antikörper an Effektorzellen

Die Bindung des biotinylierten monoklonalen Antikörpers 10BD3 an 77DG-G-166 Zellkulturen und paraffineingebettete Transplantationstumoren TI 166/77 wurde mit einer modifizierten ABC-Färbung nachgewiesen.

Paraffinschnitte und Zellkulturen wurden zunächst mit dem biotinylierten Antikörper und anschließend mit dem Avidin-Biotin - Alkalische Phosphatase-Komplex inkubiert. Nach der Inkubation mit Substrat für alkalische

Phosphatase wurde die Reaktion mit Aqua dest. gestoppt. Die 770G-G-166 Zellen zeigten bis zu einer Verdünnung des biotinylierten Antikörpers von 1:1000 noch stark positive Reaktionen, die Gewebsschnitte bis zu einer Verdünnung von 1:100.

Als Kontrolle wurde der Tumor 850G-Mg-478, mit dem der Antikörper 10BD3 in anderen immunochemischen Färbungen nicht reagiert hatte, auf dieselbe Weise gefärbt. Nur bei einer Verdünnung von unter 1:10 zeigte sich leichte Rotfärbung, was aufgrund des Verteilungsmusters ohne weiteres als unspezifische Anlagerung des Antikörpers erklärt werden kann. Bei höherer Verdünnung wurde keine Färbung erkennbar.

Die Koppelung der monoklonalen Antikörper an Peritonealmakrophagen und T-Lymphozyten wurde ebenfalls mit der ABC-Methode dargestellt:

Je 10^7 Effektorzellen wurden mit 0,5 mg des biotinkoppelten monoklonalen Antikörpers 10BD3 inkubiert. Danach wurde die Färbung wie oben fortgesetzt.

Als negative Kontrollen dienten Effektorzellen, denen anstelle des biotinylierten Antikörpers entweder 0,5 mg Biotinsulfat oder ungekoppelter Antikörper zugesetzt wurden.

Nach Beendigung der Färbung wurden die Zellen im Durchlichtmikroskop beurteilt.

Bei den mit Biotin-markierten Antikörper inkubierten Effektorzellen zeigten etwa 40 bis 60 % der T-Lymphozyten und 50 bis 70 % der Peritonealmakrophagen deutliche Markierung, während bei den negativen Kontrollen nur jeweils Zellklumpen und einige Zelltrümmer leicht angefärbt waren (Abb. 16a).

2.6 Colony-Formation-Inhibition-Assay (CFIA)

Fünf monoklonale Antikörper wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, im Zusammenwirken mit Effektorzellen aus Milz und Thymus von BALB/c-Mäusen die Kolonienbildung von Gliomzellen zu unterdrücken.

In parallel durchgeführten Experimenten wurden jeweils drei Versuchsreihen sowohl mit Makrophagen als auch mit T-Lymphozyten als Effektorzellen durchgeführt. Bei der Auswertung wurden pro Linbroloch die Kolonien in 10 Gesichtsfeldern ausgezählt; jeweils drei Linbrolöcher enthielten denselben Ansatz. Zur Bildung des Durchschnitts wurden die Kolonien addiert und durch 30 dividiert.

Der zytotoxische Index wurde in Relation zur Anzahl der Kolonien in Kontrollnäpfen, die Targetzellen allein, Targetzellen und Antikörper oder Targetzellen und Effektorzellen enthielten, ermittelt nach der Formel:

$$I_C = 1 - \frac{\text{Anzahl der Kolonien im Test}}{\text{Anzahl der Kolonien in der Kontrolle}}$$

Die Zytotoxizität in Prozent (Tab. 7 bis 16) ergibt sich aus dem Produkt von I_C und 100 ($\text{C\%} = I_C \times 100$).

Da sich die Anzahl der Targetzellen während der 24-stündigen Inkubation vor Zugabe des Antikörpers und der Effektorzellen auf etwa 10×10^3 erhöhte, wurden jeweils 5×10^5 , $2,5 \times 10^5$ bzw. 1×10^5 Effektorzellen (50:1; 25:1; 10:1) zugegeben.

Als Antikörper wurden konzentrierte serumfreie Hybridomüberstände mit einem Immunglobulingehalt von 0,5 mg/ml verwendet. Die Antikörper kamen bei den CFI-Experimenten in Verdünnungen von 1:1000 bis 1:25 zum Einsatz.

In Abb. 2 bis 11 wird die Zytotoxizität in Prozent, C%, (Ordinate) bei einem bestimmten Effektor- zu Targetzellverhältnis in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration (Abszisse) aufgetragen. Außerdem wurden die Werte der durch die jeweilige Antikörpermenge alleine verursachten Zytotoxizität eingetragen.

Bei allen Versuchen wurde der zytotoxische Index mit steigender Menge von Antikörper und Effektorzellen größer, insbesondere bei Antikörperverdünnungen unter 1 zu 100.

Die höchste Zytotoxizität (95,5 %) (Tab. 16, Abb. 11) bewirkte die Kombination von monoklonalem Antikörper 14AC1 und T-Lymphozyten bei einer Antikörperverdünnung von 1 zu 25 und 50 Effektorzellen pro Zielzelle, wobei bei diesem Ansatz die hohe zytotoxische Wirkung des nativen Antikörpers (17,2 %) auffällt. Zieht man diese ab, verbleibt eine ADCC von 78,3 %. Mit Peritonealmakrophagen zeigte der Antikörper 14AC1 ebenfalls hohe zytotoxische Wirkung (56 %) (Tab. 15, Abb. 10).

Ähnlich hohe ADCC-Werte (78 %) ergab die Kombination des monoklonalen Antikörpers 6EB4 mit T-Lymphozyten (Tab. 8, Abb. 3), die als Effektorzellen höheren Targetzelluntergang bewirkten als Makrophagen (ca. 72 %) (Tab. 7, Abb. 2).

Die Antikörper 10BD3 und 17EC5 erreichten mit Peritonealmakrophagen eine Zytotoxizität von 49 % (Tab. 9 und 13, Abb. 4 und 8), dagegen lagen die Werte mit T-Lymphozyten deutlich darunter (42 %) (Tab. 10 und 14, Abb. 5 und 9).

Nur sehr geringe Zytotoxizität vermittelt der monoklonale Antikörper 32DF5. Sie betrug mit Makrophagen 5,7 % (Tab. 11, Abb. 6), mit T-Lymphozyten 12,4 % (Tab. 12, Abb. 7).

Colony-Formation-Inhibition-Assay

		Makrophagen : Zielzellen (77DG-G-166)			
Antikörper 6EB4					
		50 : 1	25 : 1	10 : 1	0 : 1
1 : 1000		3.4	2.9	1.2	0.2
1 : 500		12.7	9.3	3.7	0.8
1 : 100		52.8	29.1	18.1	4.3
1 : 50		80.2	48.8	28.9	9.3
1 : 25		85.4	53.5	32.9	13.1
		$\% \text{ Zytotoxizität} = \left(1 - \frac{\text{Kolonien Test}}{\text{Kolonien Kontr.}}\right) \times 100$			

Tab. 7: ADCC gegen 77DG-G-166 Gliomzellen; Inkubationszeit: 96 h.

		T-Lymphozyten : Zielzellen (77DG-G-166)			
Antikörper 6EB4					
		50 : 1	25 : 1	10 : 1	0 : 1
1 : 1000		1.8	2.1	1.4	0.3
1 : 500		19.8	18.2	4.6	0.7
1 : 100		75.1	44.5	18.0	2.9
1 : 50		92.4	62.9	21.7	6.9
1 : 25		90.8	59.2	26.3	12.4
		% Zytotoxizität			

Tab. 8: ADCC gegen 77DG-G-166 Gliomzellen; Inkubationszeit 96 h.

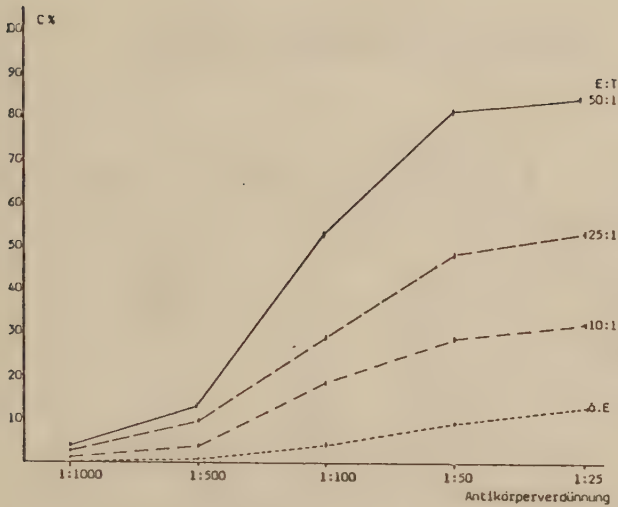


Abb. 2: Colony-Formation-Inhibition-Assay an 77DG-G-166 Gliomzellen mit Makrophagen und MAK 6EB4; Inkubationszeit 96 h.
E: Effektorzellen; T: Targetzellen; C%: Zytotoxizität in %

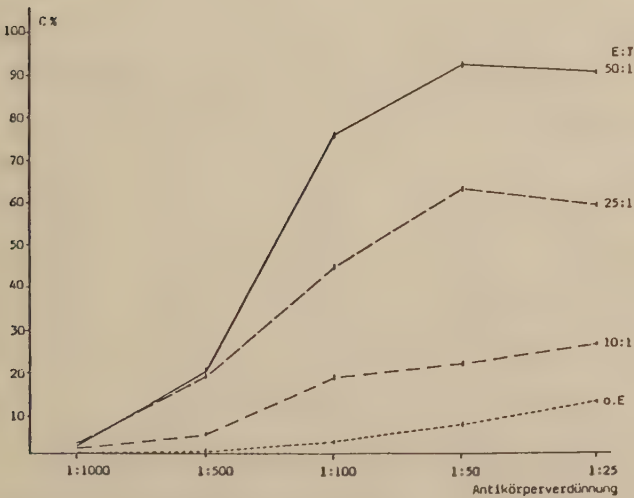


Abb. 3: Colony-Formation-Inhibition-Assay an 77DG-G-166 Gliomzellen mit T-Lymphozyten und MAK 6EB4; Inkubationszeit 96 h.
E: Effektorzellen; T: Targetzellen; C%: Zytotoxizität in %

Colony-Formation-Inhibition-Assay

Antikörper 108D3	Makrophagen : Zielzellen (77DG-G-166)			
	50 : 1	25 : 1	10 : 1	0 : 1
1 : 1000	4.5	5.2	2.7	1.2
1 : 500	14.3	8.4	3.9	1.3
1 : 100	32.8	17.8	8.4	0.8
1 : 50	48.4	34.9	14.3	3.7
1 : 25	54.7	53.8	29.3	5.2
% Zytotoxizität				

Tab. 9: ADCC gegen 77DG-G-166 Gliomzellen; Inkubationszeit: 96 h.

Antikörper 108D3	T-Lymphozyten : Zielzellen (77DG-G-166)			
	50 : 1	25 : 1	10 : 1	0 : 1
1 : 1000	4.7	3.3	1.8	0.0
1 : 500	9.2	10.4	4.1	0.2
1 : 100	27.8	22.3	19.6	0.9
1 : 50	29.1	37.1	16.3	2.1
1 : 25	42.2	37.7	12.4	6.3
% Zytotoxizität				

Tab 10: ADCC gegen 77DG-G-166 Gliomzellen; Inkubationszeit: 96 h.

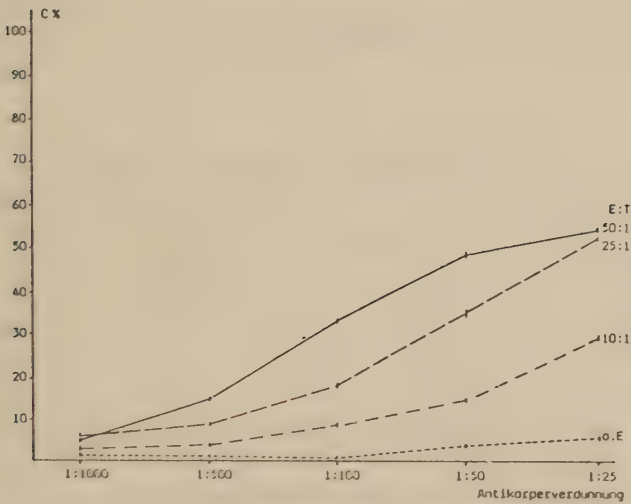


Abb. 4: Colony-Formation-Inhibition-Assay an 770G-G-166 Gliomzellen mit Makrophagen und MAK 10B03; Inkubationszeit 96 h.
E: Effektorzellen; T: Targetzellen; C%: Zytotoxizität in %

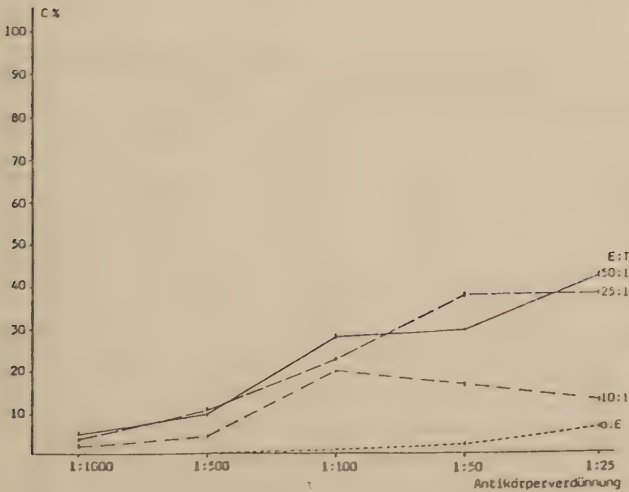


Abb. 5: Colony-Formation-Inhibition-Assay an 770G-G-166 Gliomzellen mit T-Lymphozyten und MAK 10B03; Inkubationszeit 96 h.
E: Effektorzellen; T: Targetzellen; C%: Zytotoxizität in %

Colony-Formation-Inhibition-Assay

Antikörper 32DF5	Makrophagen : Zielzellen (83DG-G-422)			
	50 : 1	25 : 1	10 : 1	0 : 1
1 : 1000	0.8	1.4	0.3	1.1
1 : 500	0.4	2.3	1.2	1.3
1 : 100	3.7	5.1	2.7	0.4
1 : 50	11.2	4.7	3.8	2.1
1 : 25	9.3	8.9	4.1	3.6
% Zytotoxizität				

Tab. 11: ADCC gegen 83DG-G-422 Gliomzellen; Inkubationszeit 96 h.

Antikörper 32DF5	T-Lymphozyten : Zielzellen (83DG-G-422)			
	50 : 1	25 : 1	10 : 1	0 : 1
1 : 1000	1.8	1.9	0.8	0.2
1 : 500	1.7	1.2	0.9	0.4
1 : 100	4.6	5.1	2.8	0.0
1 : 50	11.4	9.7	5.4	1.2
1 : 25	16.7	11.3	7.4	4.3
% Zytotoxizität				

Tab. 12: ADCC gegen 83DG-G-422 Gliomzellen; Inkubationszeit 96 h.

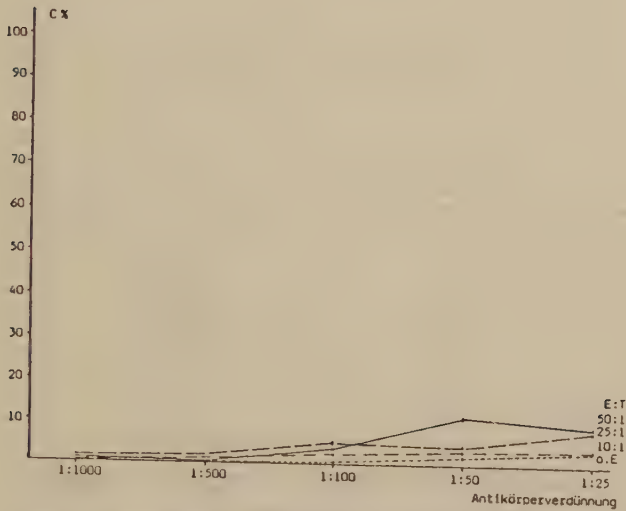


Abb. 6: Colony-Formation-Inhibition-Assay an 83DG-G-422 Gliomzellen mit Makrophagen und MAK 32DF5; Inkubationszeit 96 h.
E: Effektorzellen; T: Targetzellen; C%: Zytotoxizität in %

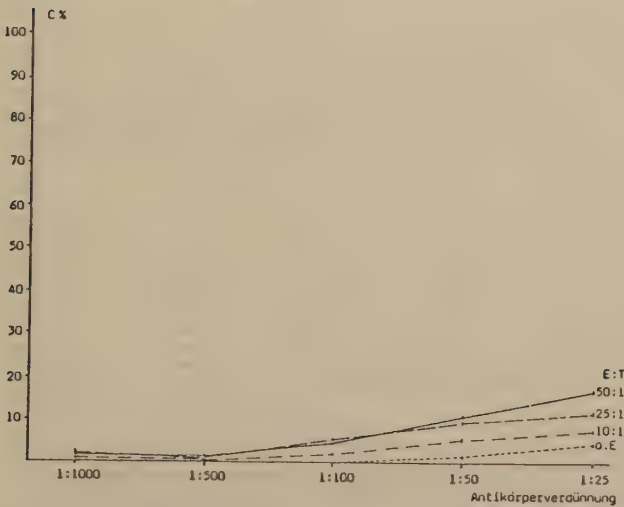


Abb 7: Colony-Formation-Inhibition-Assay an 83DG-G-422 Gliomzellen mit T-Lymphozyten und MAK 32DF5; Inkubationszeit 96 h.
E: Effektorzellen; T: Targetzellen; C%: Zytotoxizität in %

Colony-Formation-Inhibition-Assay

Antikörper 17EC5	Makrophagen : Zielzellen (83DG-G-422)			
	50 : 1	25 : 1	10 : 1	0 : 1
1 : 1000	1.5	2.3	0.9	1.4
1 : 500	1.9	5.4	2.1	1.1
1 : 100	24.6	29.1	9.4	3.7
1 : 50	43.8	38.7	18.5	2.9
1 : 25	46.7	48.0	14.1	5.1
% Zytotoxizität				

Tab. 13: ADCC gegen 83DG-G-422 Gliomzellen; Inkubationszeit 96 h.

Antikörper 17EC5	T-Lymphozyten : Zielzellen (83DG-G-422)			
	50 : 1	25 : 1	10 : 1	0 : 1
1 : 1000	3.9	1.8	1.2	0.0
1 : 500	4.7	9.4	4.8	1.4
1 : 100	23.8	25.9	9.6	0.9
1 : 50	21.4	22.3	7.4	3.3
1 : 25	35.0	29.1	14.2	4.2
% Zytotoxizität				

Tab. 14: ADCC gegen 83DG-G-422 Gliomzellen; Inkubationszeit 96 h.

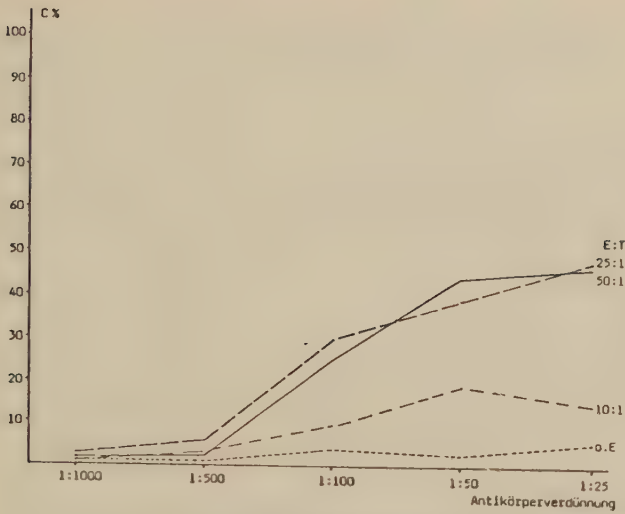


Abb. 8: Colony-Formation-Inhibition-Assay an 830G-G-422 Gliomzellen mit Makrophagen und MAK 17EC5; Inkubationszeit 96 h.
E: Effektorzellen; T: Targetzellen; C%: Zytotoxizität in %

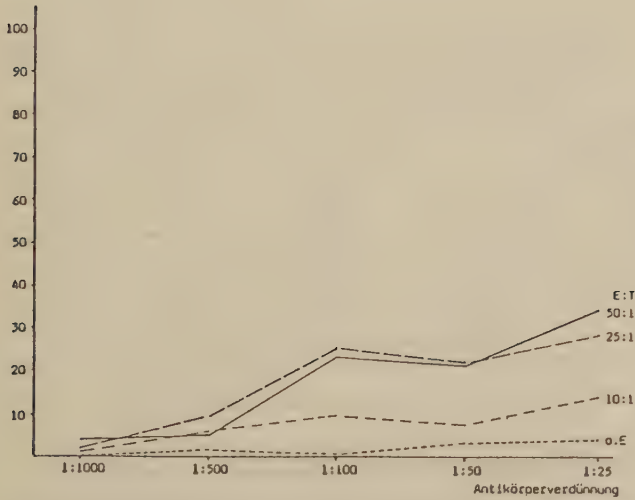


Abb. 9: Colony-Formation-Inhibition-Assay an 830G-G-422 Gliomzellen mit T-Lymphozyten und MAK 17EC5; Inkubationszeit 96 h.
E: Effektorzellen; T: Targetzellen; C%: Zytotoxizität in %

Colony-Formation-Inhibition-Assay

Antikörper 14AC1	Makrophagen : Zielzellen (79FR-G-41)			
	50 : 1	25 : 1	10 : 1	0 : 1
1 : 1000	4.2	3.2	1.4	2.0
1 : 500	34.8	22.6	9.3	1.1
1 : 100	65.1	18.3	21.4	5.8
1 : 50	63.0	64.9	30.8	9.4
1 : 25	64.3	54.3	29.4	8.3
% Zytotoxizität				

Tab. 15: ADCC gegen 79FR-G-41 Gliomzellen; Inkubationszeit 96 h.

Antikörper 14AC1	T-Lymphozyten : Zielzellen (79FR-G-41)			
	50 : 1	25 : 1	10 : 1	0 : 1
1 : 1000	6.2	8.3	3.3	1.9
1 : 500	20.0	7.8	11.6	1.8
1 : 100	68.3	43.0	22.2	3.7
1 : 50	92.3	36.9	37.8	11.7
1 : 25	95.5	71.8	46.7	17.2
% Zytotoxizität				

Tab. 16: ADCC gegen 79FR-G-41 Gliomzellen; Inkubationszeit 96 h.

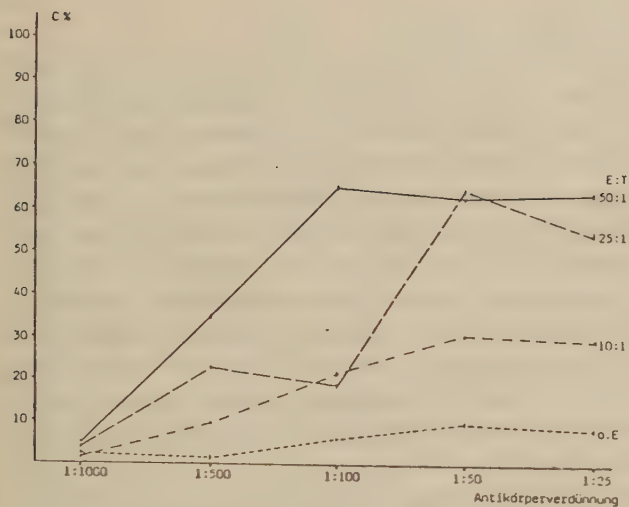


Abb. 10: Colony-Formation-Inhibition-Assay an 79FR-G-41 Gliomzellen mit Makrophagen und MAK 14AC1; Inkubationszeit 96 h.

E: Effektorzellen; T: Targetzellen; C%: Zytotoxizität in %

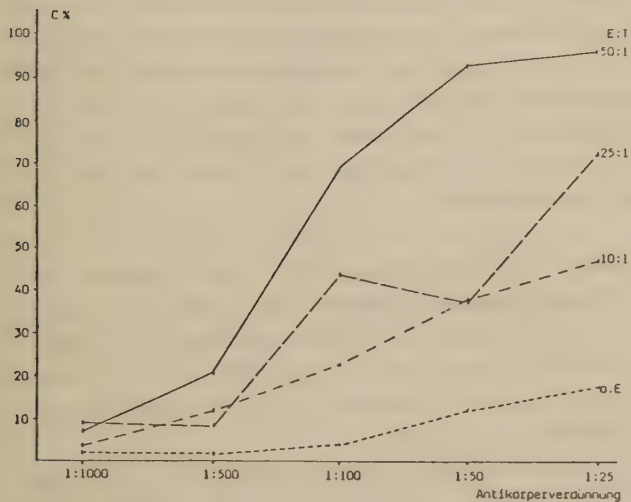


Abb. 11: Colony-Formation-Inhibition-Assay an 79FR-G-41 Gliomzellen mit T-Lymphozyten und MAK 14AC1; Inkubationszeit 96 h.

E: Effektorzellen; T: Targetzellen; C%: Zytotoxizität in %

2.7 ADCC-Versuche in vivo

Es wurden drei ADCC-Versuche mit Transplantationstumoren an BALB/c-nu/nu-Nacktmäusen durchgeführt, wobei für jede der drei Tumorzelllinien der Antikörper und die Effektorzelle verwendet wurden, welche sich bei den Koloniewachstum-Hemmungstests als am wirkungsvollsten gezeigt hatten:

Bei dem Versuch mit 79FR-G-41 Tumorzellen wurden die Tiere der Versuchsgruppe I mit dem Antikörper 14AC1 und T-Lymphozyten aus BALB/c-Mäusen behandelt, Gruppe II erhielt nur T-Lymphozyten, Gruppe III nur 14AC1-Antikörper und Gruppe IV die entsprechende Menge unspezifischen Maus-Immunglobulins.

Bei den 77DG-G-166 Transplantationstumoren wurden der monoklonale Antikörper 6EB4 und T-Lymphozyten, bei den 83DG-G-422 Transplantationstumoren der Antikörper 17EC5 mit Peritonealmakrophagen als Effektorzellen verwendet. Etwa am 6. bis 10. Tag nach der Inokulation der Tumorzellen konnten solide subkutane Transplantationstumoren getastet werden, die alle zwei Tage mit der Schublehre vermessen wurden. Aus den errechneten Tumervolumina wurde das arithmetische Mittel gebildet.

Begannen die Tumoren wegen ihrer Größe für die Mäuse beschwerlich zu werden, so wurden die Tiere einer Versuchsgruppe euthanasiert.

Das überzeugendste Ergebnis brachte der Versuch mit 79FR-G-41 Transplantationstumoren (Abb. 12). Die unbehandelten Tiere (Gruppe IV) zeigten ab dem 11. Versuchstag rasantes Tumorstadium und mußten am 17. Versuchstag bei einer durchschnittlichen Tumorstadium von 18,3 cm³ euthanasiert werden.

Die Tumoren der Gruppen II (T-Lymphozyten allein) und III (Antikörper allein) zeigten dagegen verzögertes

Tumorstadium: die Tumoren der Gruppe II erreichten 5 Tage, die der Gruppe III 8 Tage später die Größe der Tumoren in unbehandelten Tieren.

Bei der mit monoklonalen Antikörpern und T-Lymphozyten behandelten Versuchsgruppe I hingegen zeigten die Tumoren bis zum 21. Versuchstag ein stark verzögertes, aber kontinuierliches Wachstum. Vom 21. bis zum 26. Tag blieb die Tumorgroße bei 7 Tieren konstant. Am 27. Tag starb ein Tier mit einer um 27 % über dem Durchschnitt liegenden Tumorgroße, während die Tumoren der anderen Tiere kleiner wurden. Am 33. Tag war bei einem Versuchstier kein Tumor mehr fühlbar. Am 38. Tag bei einem zweiten, am 54. und 61. Tag bei einem 3. und 4. Tier. Am 93. Tag des Versuches konnte bei keinem der 7 Tiere Tumorgewebe nachgewiesen werden. Nach weiteren 14 Tagen ohne Veränderung wurde der Versuch abgeschlossen und die Tiere getötet.

Im ADCC-Versuch mit 77DG-G-166 Subkutantransplantaten konnte zwar durch Behandlung mit monoklonalen Antikörpern und T-Lymphozyten keine Tumorrepression erreicht werden, dennoch zeigte auch hier die Versuchsgruppe I bis zum 21. Tag stark verzögertes Tumorstadium (Abb. 13). Ab dem 21. Tag stieg das Tumorstadium steil an, so daß am 27. Tag die Versuchstiere der Gruppe I eingeschläfert werden mußten. Die Tumoren der unbehandelten bzw. nur mit Lymphozyten behandelten Tiere wuchsen nahezu kontinuierlich linear, wogegen die Tumoren der Gruppe III (behandelt mit Antikörper 6EB4) verlangsamtes Wachstum zeigten.

Im ADCC-Versuch mit 83DG-G-422 Transplantationstumoren, dem monoklonalen Antikörper 17EC5 und Makrophagen als Effektorzellen konnte keine Tumorregression erzielt werden. In Gruppe I war das Tumorstadium stark verzögert, wonach hier bereits ab dem 17. Versuchstag ein exponentielles Wachstum einsetzte, also nur etwa 1 Woche später als bei den Kontrollgruppen (Abb. 14).

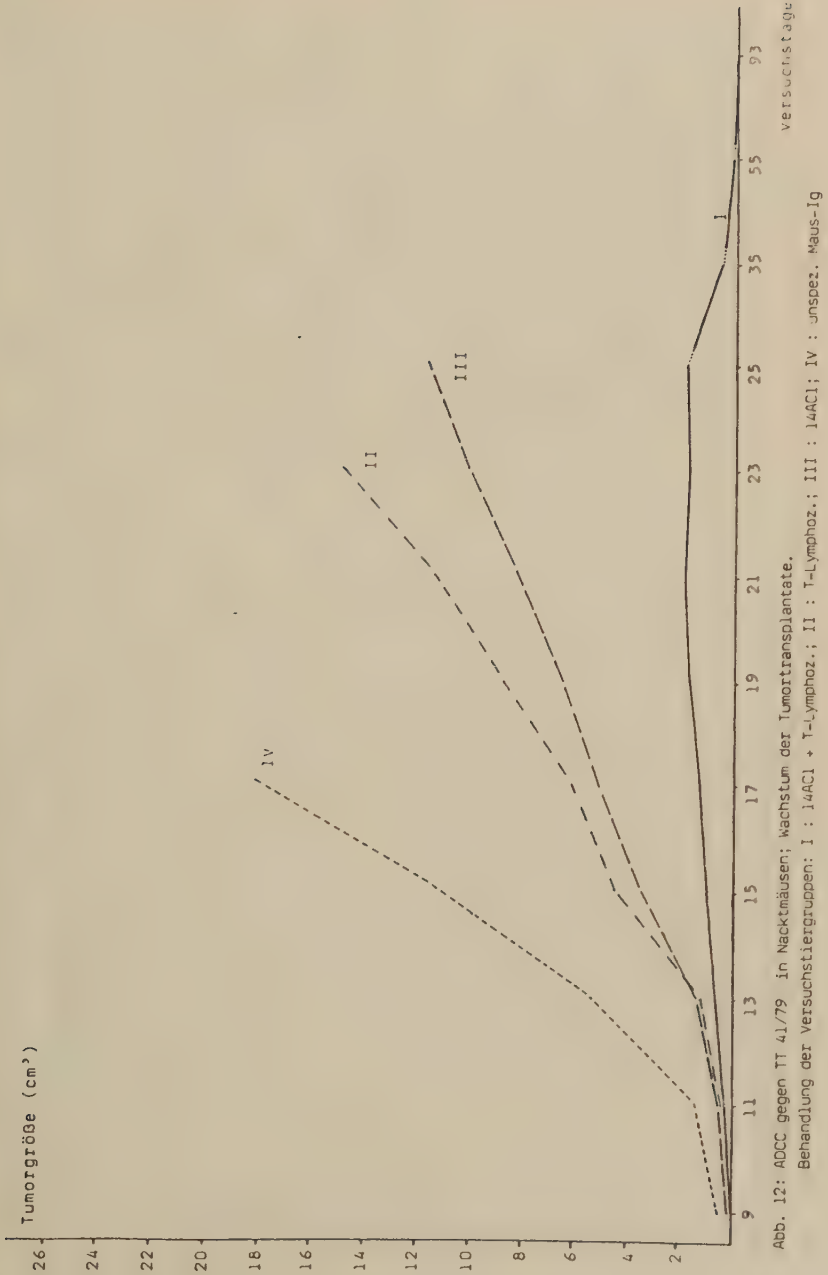


Abb. 12: ADCC gegen TI 41/79 in Nacktmäusen; Wachstum der Tumortransplantate.
Behandlung der Versuchstiergruppen: I : 14ACI + T-Lymphoz.; II : T-Lymphoz.; III : 14ACI; IV : unspez. Maus-Ig

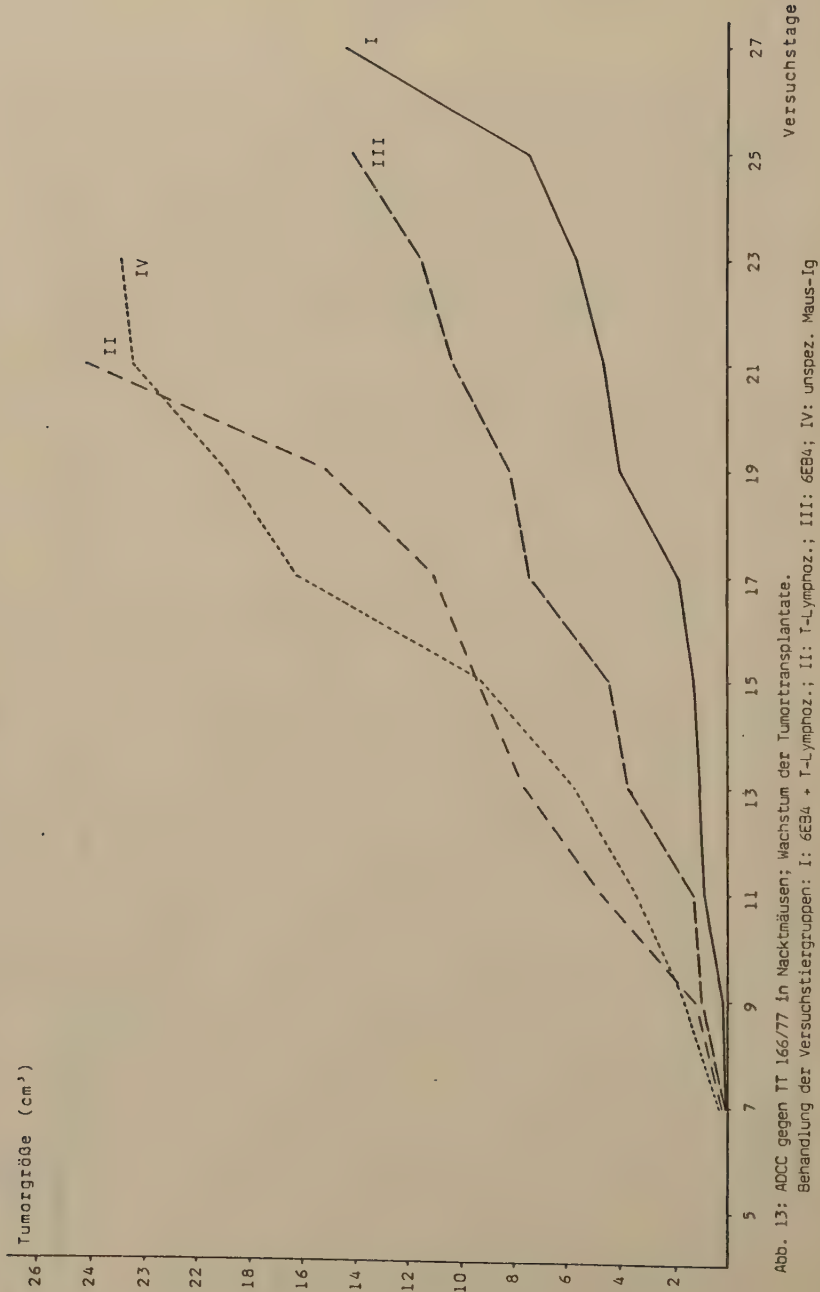
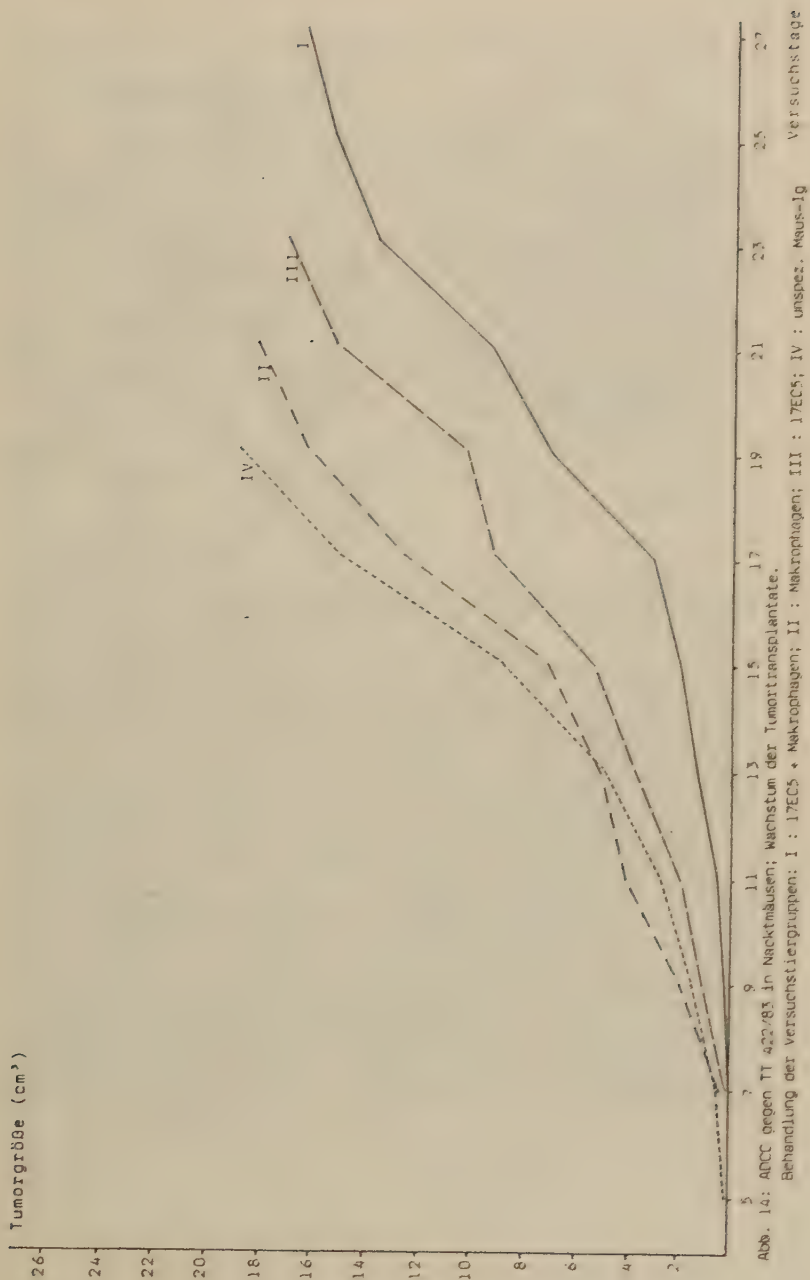


Abb. 13: ADCC gegen TT 166/77 in Nacktmäusen; Wachstum der Tumortransplantate.
Behandlung der Versuchstiergruppen: I: 6EB4 + T-Lymphoz.; II: T-Lymphoz.; III: 6EB4; IV: unspez. Maus-Ig



2.8 Licht- und elektronenmikroskopische Darstellung der ADCC

Die in Tab. 1 gezeigten Versuche wurden licht- und elektronenmikroskopisch ausgewertet (Abb. 16b,c und 17a-d). Nach 30(I)- bzw. 60(II)-minütiger Inkubation von Antikörper-gekoppelten Zielzellen und Effektorzellen konnten deutliche Lysiseffekte beobachtet werden, die sich vor allem in einer Aufblähung des Tumorzelleibes zeigte. Elektronenmikroskopisch bietet sich überwiegend das Bild der Apoptose, d. h. einer gleichzeitigen Kondensation des Kerns und Auflösung des Zytoplasmas und der Zellmembran (Abb. 17c,d). Der größte Teil der Tumorzellen war deutlich mit DAB-Substrat angefärbt.

Nach 180(III) Minuten war die Anzahl der Tumorzellen erheblich reduziert, was auf vermehrte Zellysis oder aber Ablösung der Zellen vom Flaschenboden zurückzuführen ist.

Ein anderes Bild zeigt sich nach 24 bzw. 48 Stunden (IV,V): Hier befinden sich wesentlich mehr Tumorzellen in der Flasche als bei den ersten drei Ansätzen. Hinzu kommt, daß die meisten dieser Zellen nur sehr schwach mit DAB markiert sind. Bei den am Gefäßboden haftenden Tumorzellen sind deutlich weniger Lysiserscheinungen zu sehen als in Ansatz I bis III.

Bei Ansatz VII, bei dem die Effektorzellen 60 Minuten lang mit dem monoklonalen Antikörper inkubiert, gewaschen, und 60 Minuten mit den Tumorzellen inkubiert worden waren, sind die Tumorzellen ungefärbt, an den Zellen sind aber deutliche zytopathische Effekte zu erkennen.

Ansatz VI (Suspension) entspricht in etwa dem Bild von Ansatz II, nur daß wesentlich mehr Effektor/Targetzell-Kontakte zu sehen sind.

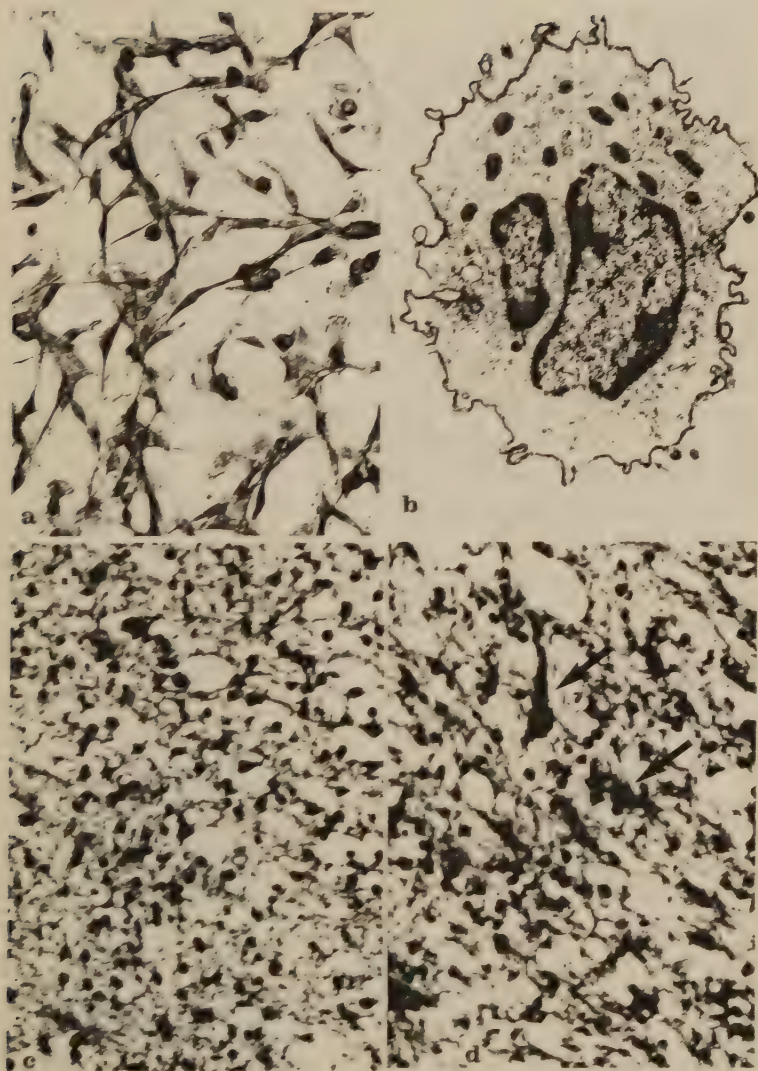


Abb. 15

Abb. 15:

- a) Zellkultur 77DG-G-166
Indirekte Immunperoxidase; MAK 5CC3 färbt die
Tumorzellmembran der meisten Zellen homogen an.
x 320.

- b) Darstellung der Antikörperbindung
MAK 5CC3; Gliomzelle der Linie 77DG-G-166;
Reaktionsprodukt ist an der gesamten Zellober-
fläche lokalisiert (→).
TEM x 6300.

- c) Primärtumor N 166/77, Paraffinschnitt
Kleinzelliger, gut differenzierter, astrozytärer
Aufbau des Tumors.
ABC-Färbung mit MAK 6EB4; Gegenfärbung mit
Hämalaun.
Keine erkennbare Reaktion des Antikörpers.
x 260.

- d) Primärtumor N 166/77, Paraffinschnitt
ABC-Färbung mit MAK 11EC7; Gegenfärbung mit
Hämalaun.
Einzelne Zellen und Fortsätze werden deutlich
angefärbt ().
x 260.

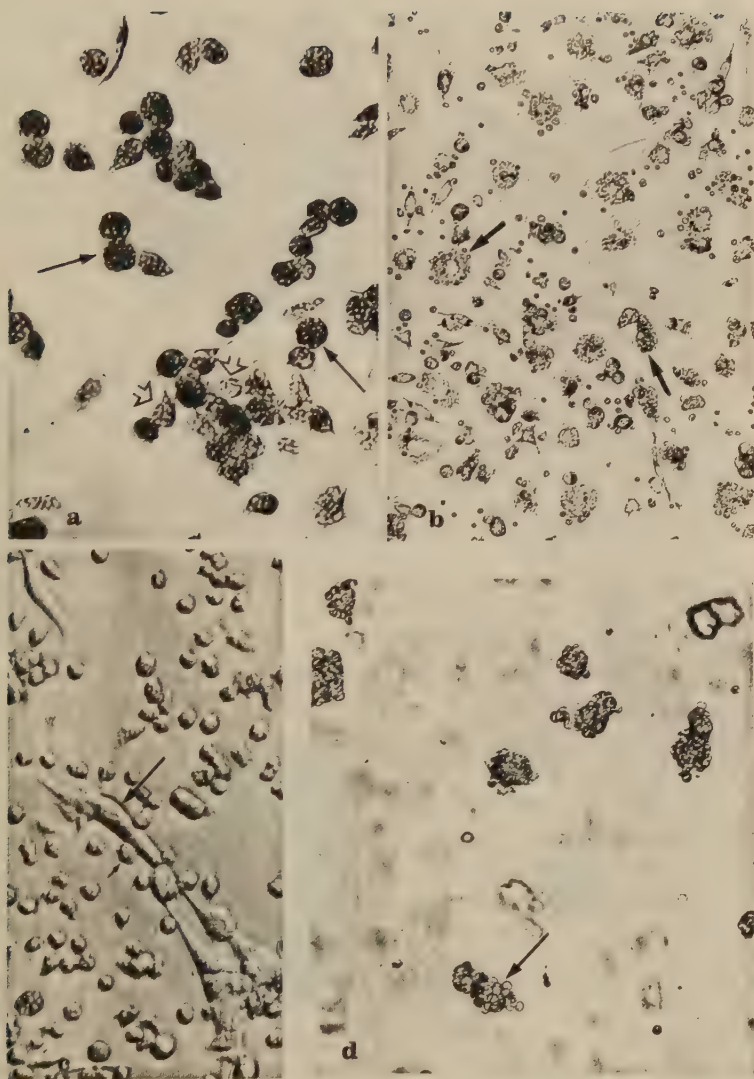


Abb. 16

Abb. 16

- a) Markierung von Makrophagen mit Biotin-gekoppelten
MAK 10B03

Ein Teil der Makrophagen ist markiert (→),
ein Teil ist nicht markiert (↗).

ABC-Färbung.

x 780.

- b) ADCC in vitro

77DG-G-166 Tumorzellen mit Antikörper-'fran-
kierten' Makrophagen (1:10)

Inkubationszeit: 60 min

Zytolyse (→).

x 320.

- c) ADCC in vitro

77DG-G-166 Tumorzellen und Makrophagen (1:10)

Anlagerung von Makrophagen (↔) an Tumor-
zellen (→)

Aufnahme 5 min nach Makrophagenzugabe
Phasenkontrast.

x 420.

- d) Colony-Formation-Inhibition-Assay

77DG-G-166 Zellkolonien (→) in Soft-Agar 5
Tage nach ADCC-Behandlung.

x 220.

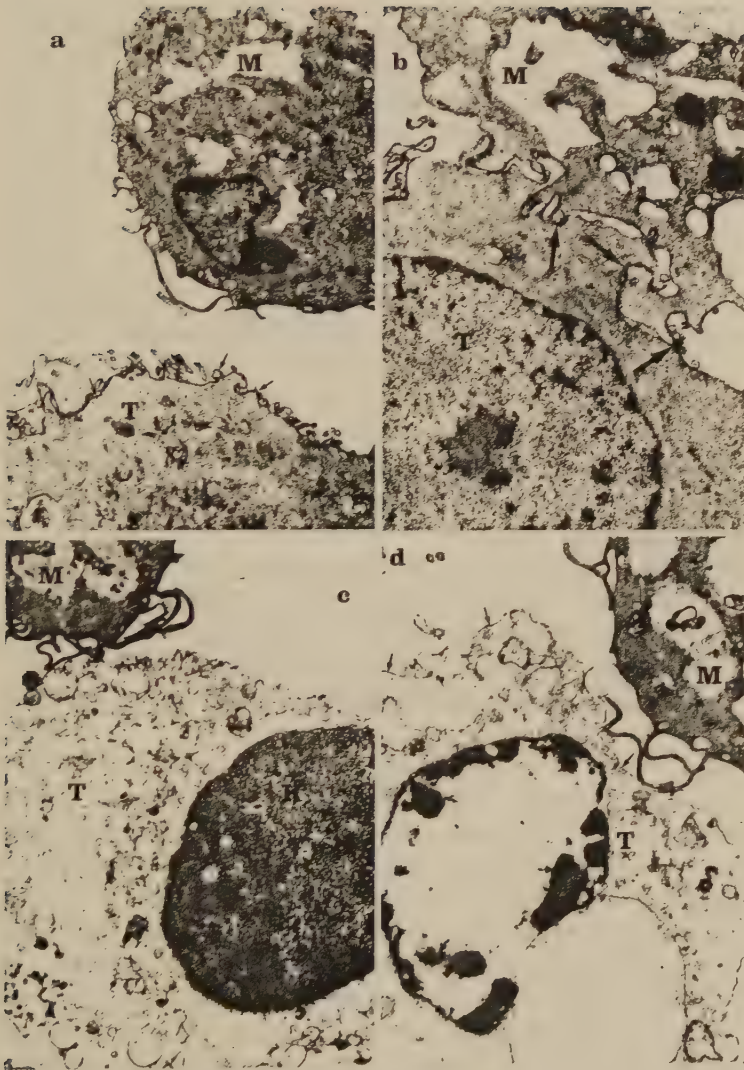


Abb. 17

Abb. 17: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
in vitro; Transmissionselektronenmikroskopie.

T: Tumorzelle 77DG-G-166

M: Peritonealmakrophage

- a) Tumorzelle 77DG-G-166 mit Antikörpermarkierung
der Zellwand (→).
x 7800.
- b) Innige Anlagerung des Makrophagen an die Tumorzelle. Markierung der Zellwand der Tumorzelle
mit Antikörper (→→).
x 8200
- c) Apoptotischer Zelluntergang: gleichzeitige
Kondensation von Zytoplasma und Zellkern (K).
x 7200.
- d) Endstadium des Tumorzellunterganges mit
Karyoplasmakondensation entlang der Kernmembran
und Vakuolenbildung im Zytoplasma.
Reste der Antikörpermarkierung der Zellwand (→).
x 7200.

D Diskussion

Voraussetzung der vorliegenden Untersuchungen war die Produktion monoklonaler Antikörper gegen Zelloberflächenantigene spontaner Gliome des Hundes.

Aus Fusionsprodukten zwischen Myelomzellen der Linie X63-Ag.8.653 und Milzzellen von Mäusen, die mit TNBS-modifizierten Hundeastrozytomzellen der Linie 77DG-G-166 immunisiert worden waren, wurden 313 Hybridome etabliert. Davon bildeten 148 Antikörper, die mit Astrozytomzellen reagierten. Dies entspricht einer Rate von 47,3 % positiver Kolonien. Die Stärke der Immunreaktion erklärt sich zum einen durch die TNBS-Modifikation der Gliomzellen (Lemonnier et al., 1978), die auch in anderen Gliommodellen gute Erfolge gezeigt hat (Stavrou et al., 1980), zum anderen durch die Hyperimmunisierung (zweimalige Grundimmunisierung in dreiwöchigem Abstand, Boosterung mit hoher Antigenmenge nach einer Ruhezeit von vier Monaten). Darauf dürfte auch die Tatsache zurückzuführen sein, daß die näher charakterisierten Antikörper alle der IgG-Klasse angehören (Gerhard et al., 1980).

Die Hybridomüberstände wurden so früh wie möglich auf ihren Gehalt an Gliomantikörpern untersucht. Diese erste Selektion wurde mit dem micro-ELISA Verfahren durchgeführt, wobei sich insgesamt 50 Überstände als positiv erwiesen. Im Hinblick auf die spätere Verwendung der Antikörper für licht- und elektronenmikroskopische Darstellung der Antigen-Antikörper Bindungsstellen wurden diese 50 Überstände noch am selben Tag mit einer indirekten Immunperoxidasefärbung als zweitem und entscheidendem Verfahren untersucht, wobei 7 Antikörper unspezifisches Bindungsverhalten zeigten. 43 positive Hybridome wurden kloniert und nach 10 Tagen erneut

getestet. Dabei zeigte sich, daß 9 Klone ihre Antikörperproduktion eingestellt hatten. Dieses Phänomen wurde auch von anderen Untersuchern festgestellt (Köhler et al., 1976, Hengartner et al., 1978, Galfré et al., 1980) und ist wohl in erster Linie auf Chromosomenverluste der Hybridomzellen zurückzuführen. Um stabile Klone zu erhalten, wurden die Hybridome während der gesamten Untersuchungszeit wiederholt rekloniert.

Zur Selektion von Hybridomen für die ADCC-Versuche wurden die Überstände in einer indirekten Immunperoxidasefärbung an Hirnzellen, Fibroblasten und Nierenzellen neugeborener Hunde getestet. Die 20 mit einer oder mehreren dieser Zellarten reagierenden Antikörper wurden nicht in die Untersuchungen der ADCC einbezogen. Darüberhinaus wurden Absorptionsversuche mit 77DG-G-166 sowie mit Nieren- und Hirnzellen neugeborener Hunde durchgeführt. Damit sollten unspezifische Bindungen der Gliomantikörper ausgeschlossen werden. Nach Inkubation von 5 µl Kulturüberstand mit 10^6 Gliomzellen war kein Antikörper mehr nachweisbar. Vergleichbare Relationen fanden auch Wikstrand et al. (1982). Dagegen wurde der Antikörpergehalt der Überstände bei Inkubation mit Nieren- bzw. Hirnzellen kaum verringert.

Zur Spezifizierung der Antikörper wurde ihr Reaktionsverhalten gegenüber 10 Tumorzelllinien (2 Gliome, 2 Meningome und 1 Melanom des Hundes, 1 Melanom des Menschen, 1 Melanom der Maus, 3 Mini-pig Melanome) getestet. Zwei der untersuchten 9 Antikörper reagierten nur mit Hundegliomzellen, die anderen zeigten Kreuzreaktionen mit Melanomzellen. Das Vorkommen gemeinsamer Antigene auf Gliom- und Melanomzellen wird in zahlreichen Publikationen bestätigt (Dippold et al., 1980; Liao et al., 1981; Cahan et al., 1982; Carrel et al., 1982; 1983; Pukel et al., 1982; Wikstrand et al., 1982; Wikstrand und Bigner, 1982; Saxton et al., 1982). Milstein et al.

(1980) äußerten den Verdacht, daß manchen solcher Kreuzreaktionen eine 'intrinsic cross reactivity' monoklonaler Antikörper zugrunde liegen könnte. Überhaupt können monoklonale Antikörper derart spezifisch sein, daß sie Molekularsequenzen von der Größe weniger Kohlenhydratbruchstücke markieren, die auf Zellen vorkommen können, die weder physiologische noch entwicklungsgeschichtliche oder strukturelle Beziehungen zueinander haben. Solche Antigen-Epitope werden auch als 'jumping antigenic determinants' bezeichnet (Milstein und Lennox, 1980; Barald und Wessells, 1984).

Die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen an Primärtumoren und Transplantationstumoren sind uneinheitlich. Die Antikörper 5CC3, 6EB4 und 17EC5 erkannten zwar die Tumorzellen in der Zellkultur und im Kryostatschnitt des jeweiligen Transplantationstumors, nicht aber in paraffineingebettetem Material. Da Kryostatschnitte und paraffineingebettete Schnitte von demselben Tumormaterial gewonnen wurden, dürfte der Reaktionsverlust auf eine Antigendenaturierung während der Gewebepräparation und Paraffineinbettung zurückzuführen sein. In zahlreichen Untersuchungen wurde bemerkt, daß sich die Art der Gewebepräparation maßgeblich auf die Reaktivität und somit Darstellbarkeit monoklonaler Antikörper auswirkt (Van Ewijk et al., 1980; Hansmann et al., 1984; Walker et al., 1984; Puchtler und Mcloan, 1985; Taylor, 1985). So können vor allem labile Antigene wie die zellmembrangebundenen tumorassoziierten Antigene durch Fixation und Einbettung relativ leicht in einem Maße alteriert werden, daß sie auch mit empfindlichen immunhistologischen Färbemethoden nicht mehr dargestellt werden können.

Der monoklonale Antikörper 32DF5 reagiert zwar deutlich mit Zellen des paraffineingebetteten Transplantationstumors IT 422/83, ist jedoch am Paraffinschnitt des

Primärtumors nicht nachweisbar. Wahrscheinlich ist dies auf eine bessere Antigenerhaltung bei der Einbettung in niederschmelzendem Paraffin (40 °C gegenüber 56 °C) zurückzuführen. Es wäre aber auch vorstellbar, daß das Antigen, gegen das der Antikörper gerichtet ist, entweder nicht oder nicht in ausreichender Dichte auf den Zellen des Primärtumors vorhanden ist. Die Ursache könnte eine in vitro-Transformierung der Tumorzellen im Laufe der Zellzüchtung sein, wie sie unter anderem von Zur Hausen et al. (1966), Parshad und Sanford (1968), Reed und Schatz (1969) und Thust (1971) beschrieben worden ist.

Die für den Ablauf der ADCC notwendige Verbindung von Effektorzelle und Antikörper via Fc-Rezeptor wurde nach Koppelung der monoklonalen Antikörper mit Biotin mit einer direkten Avidin-Biotin-Färbung von Tumorgewebschnitten dargestellt. Die Anheftung des Antikörpers an die Effektorzellen konnte nach Inkubation von biotinyliertem 10BD3 und Makrophagen bzw. T-Zellen und anschließende Avidin-Biotin-Reaktion nachgewiesen werden. Da die Fc-Rezeptor-Bindung relativ schwach ist, ist nach wiederholtem Waschen bei der Färbung nur noch ein Teil der Effektorzellen markiert.

Als Testmethode für die Untersuchung der ADCC in vitro wurde der Colony Formation Inhibition Assay verwendet, da mit ihm am sichersten ermittelt werden kann, wieviel Tumorzellen nach der Inkubation mit Effektorzellen und Antikörper noch lebens- und teilungsfähig sind. Der subjektive Einfluß des Untersuchers in der Beurteilung der Vitalität der Tumorzellen - wie er beim Mikrozytotoxizitätstest nach Takasugi und Klein (1970) gegeben ist - entfällt. Außerdem besteht nicht die Gefahr der Verwechslung von Effektor- und Zielzellen, da sich

unter diesen Umständen weder Makrophagen noch T-Lymphozyten teilen und Kolonien bilden können. In Softagar suspendierte Zellen wurden in die Näpfe von 24-Linbroplatten gegossen. Dieses Verfahren erlaubt eine schnellere und bequemere Auszählung der Kolonien, als wenn der Agar in Petrischalen überführt wird. Hinzu kommt, daß dadurch die Gefahr der Infektion der Kulturen bei mehrtägiger Inkubation im Brutschrank erheblich reduziert wird.

Die ADCC-Versuche wurden mit fünf Antikörpern der Immunglobulinklassen G2a, G2b, G1 und M durchgeführt, wobei sowohl T-Lymphozyten, als auch Peritonealmakrophagen als Effektorzellen verwendet wurden. Dabei wurde mit Effektor/Targetzell - Relationen von 10 : 1, 25 : 1 und 50 : 1 sowie mit Antikörperverdünnungen von 1 : 25, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 500 und 1 : 1000 gearbeitet. Damit sollte der Einfluß von Antikörperisotyp, Antikörpermenge, Effektorzellart und -menge auf die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität gegen Gliomzellen untersucht werden.

Mit dem Antikörper 14AC1, einem IgG2a, konnte mit T-Lymphozyten eine Zytotoxizität von über 95 % erreicht werden. Dies steht im Gegensatz zu den Befunden von Herlyn et al. (1982, 1985), die für IgG2a - Antikörper Makrophagen als wirksame Effektorzellen postulieren. Zwar konnte auch mit Makrophagen ein hoher Zytolyseindex beobachtet werden, der aber um 30 % geringer ausfiel.

Bei dem der Immunglobulinklasse G2b angehörigen Antikörper 6EB4 erwiesen sich ebenfalls T-Lymphozyten als bessere Effektorzellen (90,8 % Zytolyse gegenüber 85,4 % bei den Makrophagen).

Der IgG1 - Antikörper 10BD3 dagegen vermittelte mit Makrophagen eine um 12 % höhere Zytotoxizität als mit T-Lymphozyten (54,7 % / 42,2 %), wobei der Unterschied

bei kleineren Effektor-/Targetzell-Relationen noch deutlicher zugunsten der Makrophagen ausfiel.

Mit dem der IgM- Klasse zugehörigen Antikörper 32DF5 konnten weder mit T-Lymphozyten noch mit Makrophagen hohe Zytolyseraten bewirkt werden. Andere Untersucher (von Blair et al., 1976; Wählin et al., 1976; Lamon et al., 1982) konnten dagegen auch mit dieser Immunglobulinklasse zytotoxische Reaktionen erzielen. Es scheint sich zu bestätigen, daß die Natur der Targetzelle sehr wesentlich den wirksamen Antikörpersotyp mitbestimmen, daß aber generell alle Antikörper der IgG- Klasse hochwirksam sind.

Bei Effektor-/Targetzell-Verhältnissen unter 25 : 1 war im allgemeinen der zytotoxische Index gering. Dies ist damit erklärbar, daß sich bei diesen Zellzahlen zu wenig Kontakte zwischen Effektorzellen und Tumorzellen ergeben.

Die 14AC1 - abhängige zytotoxische Wirkung der Mäuse - T-Lymphozyten in vitro konnte auch im experimentellen Behandlungsversuch nachgewiesen werden. Bei sieben von acht behandelten Tieren entwickelten sich subkutane Tumortransplantate, die am 21. Versuchstag eine durchschnittliche Größe von nahezu 2 cm^3 erreicht hatten, in ihrer Größe zurück, und waren am 61. Tag nicht mehr palpierbar. In einer darauffolgenden 32tägigen Beobachtungszeit ließ sich kein erneutes Tumorstadium feststellen. Zusätzlich bemerkenswert ist, daß sich der Erfolg nach nur zwei Antikörper- und Effektorzelleninjektionen einstellte. Die Verabreichung des Antikörpers 14AC1 allein, ohne Effektorzellen, erbrachte zwar keine Tumorrepression, aber ein deutlich verzögertes Wachstum der Transplantate. Hier wirkten offensichtlich die 'endogenen' Makrophagen der Nacktmaus als Effektorzellen.

Auch im Behandlungsversuch mit 6EB4 und T-Lymphozyten zeigte sich die Potenz der ADCC bei der Bekämpfung von Tumorzellen. Bis zum 17. Versuchstag wuchsen die Transplantate der behandelten Mäuse nur sehr langsam; erst am 19. Tag glich sich die Wachstumsgeschwindigkeit der der unbehandelten Tumoren an. Möglicherweise wäre dies mit weiteren Antikörperbehandlungen zu verhindern gewesen.

Die geringste Tumorstillstandsbeförderung erbrachte die ADCC mit dem monoklonalen Antikörper 17EC5 und Peritonealmakrophagen. Hier konnte durch die Behandlung lediglich eine Wachstumsverzögerung von 4 bis 8 Tagen erreicht werden. Dieser Antikörper hatte bereits bei in vitro Experimenten nur einen relativ geringen zytopathischen Effekt von 45 % gezeigt.

Da Fc-Rezeptor-positive Zellen wirksame Effektorzellen für die ADCC darstellen, empfiehlt sich zur Erreichung einer Tumorstillstandsbeförderung die kombinierte Verabreichung mehrerer Effektorzellarten, die sich in ihrer Wirkung summieren könnten.

Die licht- und elektronenmikroskopische Auswertung von ADCC - Versuchen mit 77DG-G-166 Tumorzellen, monoklonalem Antikörper 6EB4 und Peritonealmakrophagen als Effektorzellen zeigen den Verlauf der Zellyse. Bereits nach 30 Minuten gemeinsamer Inkubation waren viele Tumorzellen geschädigt. Auch Espevik und Hammerström stellten 1983 fest, daß Monozyten antikörperbedeckte menschliche Leukämiezellen zu 70 % innerhalb der ersten Kokultivationsstunde lysieren. Auffällig war die Häufung des apoptotischen Zelluntergangs. Der größte Effekt war dabei bei Versuchsansatz VI zu sehen, bei dem die Zellen im Reagenzglas bei leichtem Schütteln in Bewegung gehalten wurden, so daß vermehrte Möglichkeiten für Kontakte zwischen Effektor- und Targetzellen

geschaffen wurden. Die deutliche Markierung der Tumorzellen in den Ansätzen I bis III beweist, daß sich der Antikörper 6E84 an die Oberflächenmembranantigene der Gliomzellen anheftet. Die schwache und nur bei einem Teil der Zellen vorhandene Anfärbung in den Ansätzen IV und V und die große Zahl intakter Tumorzellen könnte durch die lange Inkubationszeit von 24 bzw. 48 Stunden erklärt werden: In dieser Zeitspanne konnten sich nicht geschädigte Tumorzellen vermehren, während die Antikörper entweder mit den Zellmembrantrümmern der lysierten Zellen während der Färbung dekantiert wurden, oder sich mit ihrem Fc-Teil an die Fc-Rezeptoren der Makrophagen koppelten, die am Plastikboden der Flasche hafteten.

Im Versuchsansatz VII wurden Tumorzellen mit antikörpergekoppelten Makrophagen inkubiert. Hierbei ist elektronenmikroskopisch keine Reaktion der Tumorzellwand mit dem Antikörper erkennbar, da der an Fc-Rezeptoren der Makrophagen gebundene Antikörper keine Bindungsmöglichkeit für den Brückenantikörper bietet. Eine Anwendung der ABC-Technik für die Elektronenmikroskopie (Darstellung des Antikörpers über Avidin-Biotin-Bindung) gelang im Rahmen dieser Untersuchungen nicht. Durch die hohe Zytolyserate wird dennoch deutlich, daß derart armierte Effektorzellen sehr effiziente ADCC-Mediatoren sind.

Ein entscheidender Vorteil dieser Methode liegt in der Verringerung der zu applizierenden Antikörpermenge.

Diese Untersuchungen zeigen, daß gegen experimentelle und spontane Gliome Antikörper produziert werden können, die in der Lage sind, Oberflächenstrukturen der Tumorzellen zu erkennen und wirksame zellvermittelte Reaktionen zu initiieren. Gliomassoziierte Antigene bei spontanen Gliomen des Hundes werden dabei durch monoklonale Antikörper definiert, von denen einige auch mit

anderen - überwiegend neuroektodermalen - Geweben reagieren. Die Existenz gemeinsamer Antigene auf Abkömmlingen eines oder auch verschiedener Keimblätter ist vielfach belegt (Lit. Einleitung). Inwieweit dies die Nutzanwendung immunologischer Techniken in Diagnose und Therapie der Gliome beeinflussen wird, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt schwer abzuschätzen.

E Zusammenfassung

Unter Verwendung monoklonaler Antikörper wurde die ADCC (antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität) gegen ein Astrozytom und ein Oligodendrogliom des Hundes sowie ein experimentelles Rattengliom untersucht.

Durch Fusion von Milzzellen immunisierter Mäuse mit Mausmyelomzellen der Linie X63-Ag8.653 wurden antikörperproduzierende Hybridome hergestellt. Von 43 Hybridomkolonien, die Antikörper gegen Gliomzellantigene produzierten, wurden neun Klone selektiert, die mit den Gliomzellen, nicht aber mit normalen Hirnzellen, Nierenzellen und Fibroblasten von Hunden reagierten. Davon wurden vier gemeinsam mit weiteren vier monoklonalen Antikörpern gegen ein Hundeoligodendrogliom und einem monoklonalen Antikörper gegen ein experimentelles Rattengliom für die weiteren Untersuchungen verwendet. Zur Feststellung gemeinsamer antigener Determinanten wurden Immunfärbungen mit Gliomen und Menigomen des Hundes sowie Melanomen von Mensch, Maus und Mini-Pig durchgeführt. Zwei Antikörper reagierten nur mit Hundegliomzellen, zwei außerdem auch mit Hunde- bzw. Mini-Pig-Melanomzellen. Es wurden gemeinsame Epitope bei Gliom-, Melanom- und Meningomzellen des Hundes nachgewiesen; einzelne monoklonale Antikörper zeigten Kreuzreaktionen mit Zellen des humanen Melanoms und des Rattenglioms. Mit der indirekten Immunperoxidase-, der Avidin-Biotin- und der PAP-Technik wurde die Bindungsreaktion monoklonaler Antikörper an Zellkulturen, Primär- und Transplantationstumoren licht- und elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht.

Mit Kolonienbildungshemmungs-Tests konnte gezeigt werden, daß sich sowohl T-Lymphozyten, als auch Peritonealmakrophagen als Effektorzellen in der ADCC eignen.

Die zytotoxische Wirkung stieg mit Antikörperkonzentration und Effektorzell-Zahl an. Vor allem der IgG2a-Antikörper 14AC1 bewirkte eine hohe Zytotoxizität; auch die IgG2b-Antikörper 6EB4 und 17EC5 sowie der IgG1-Antikörper 10BD3 lieferten hohe Zytolyseraten. Mit dem IgM-Antikörper 32DF5 konnten nur sehr geringe zytolytische Effekte auf die Zielzellen erzielt werden.

Die Wirkung der ADCC wurde auch mit experimentellen Behandlungsversuchen an tumortragenden Nacktmäusen nachgewiesen. Durch zweimalige Injektion von monoklonalen Antikörpern und Effektorzellen konnte das Wachstum der Tumortransplantate nachhaltig verringert werden. Bei einem Versuch konnte eine Regression der Tumoren erreicht werden.

Summary

Experimental Investigations About Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity Against Canine Gliomas

Using monoclonal antibodies, ADCC (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) against canine astrocytoma-, oligodendroglioma- and experimental rat glioma cells was examined.

Fusion of spleen cells from glioma-immunized mice and X63-Ag8.653 mouse myeloma cells generated 43 hybridoma clones which were found to produce antibodies against antigens on glioma cell surfaces. 9 antibodies reacting only with glioma cells, but not with canine fibroblasts, brain and kidney cells were selected by ELISA and indirect immunoperoxidase staining. 4 of these, together with 4 monoclonal antibodies raised against a canine oligodendroglioma cell line and a monoclonal antibody against a rat glioma were used for further experiments. These antibodies were tested for cross reactivity and shared antigenic determinants by immunological staining with canine gliomas, meningiomas and melanomas as well as human, murine and mini-pig melanomas. Two of them reacted only with canine glioma cells, two also with canine and mini-pig melanoma cells respectively. Common epitopes were detected on canine glioma, melanoma and meningioma cells; some antibodies showed cross reactivity with human melanoma cells and chemically induced rat glioma cells. By staining with indirect immunoperoxidase, Avidin-Biotin and PAP technique, binding of monoclonal antibodies to cell lines, primary and secondary tumors was visualized by light- and electron microscopy.

Colony-Formation-Inhibition-Assays indicated the suitability of T-lymphocytes and peritoneal macrophages as effector cells in ADCC. Cytotoxic efficiency increased with antibody concentration and quantity of effectors. The IgG2a antibody 14AC1 mediated the highest cytotoxicity, but also the IgG2b antibodies 6EB4 and 17EC5 as well as the IgG1 10BD3 yielded high cytolysis. In contrast, only mean cytotoxic reactions could be achieved using the IgM antibody 32DF5.

The in vivo effects of ADCC were shown by therapy of tumor-bearing nude mice. Two injections of monoclonal antibodies and effector cells reduced tumor growth markedly. In one test complete regression of tumor transplantates could be achieved.

F Literaturverzeichnis

Ashwood-Smith MJ:

Preservation of mouse bone marrow at -79 °C with dimethylsulfoxide.
Nature 190: 1204-1205, 1961

Baker MA, Taub RN:

Immunotherapy of human cancer.
Progr Allergy 17: 227, 1973

Barald KF, Wessells NK:

Differential antigen adhesivity used to select spleen cells for the
production of monoclonal antibodies to embryonic neurons.
J Immunol Meth 73: 1, 1984

Benaceraff B, Unanue ER:

Immunologie. Ein Kurzlehrbuch.
Walter de Gruyter Verlag, Berlin/New York, 1982

Bernstein ID, Tam MR, Nowinski RC:

Mouse leukemia: therapy with monoclonal antibodies against a thymus
differentiation antigen.
Science 207: 68, 1980

Bilzer I:

Experimentelle Untersuchungen zum Nachweis zellulärer Immunreaktionen
gegen chemisch induzierte Gliome der Ratte.
Diss med vet, München, 1978

Bilzer I:

Depression of experimental intracranial glioma growth by
antibody-carrying T-cells.
J Cancer Res Clin Oncol 109: A21, 1985

Bilzer I, Stavrou D, Dahme E, Anzil AP:

Cell-mediated immune response in rats immunized with chemically
modified syngeneic glioma cells. Monitoring by in vivo parameters and
in vitro immune cytotoxicity.
Anticancer Res 2: 345, 1982

Bilzer I, Stavrou D, Mellert W:

Cell-mediated lysis of glioma cells directed by monoclonal
antibodies.
Brit J Cancer 50: 563, 1984

Blair PB, Lane MA, Mar P:

Antibody in the sera of tumorbearing mice that mediates spleen cell
cytotoxicity toward autologous tumor.
J Immunol 116: 606, 1976

- Bourdon MA, Wikstrand CJ, Furthmayr H, Matthews TJ, Bigner DD:
Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by
monoclonal antibody.
Cancer Res 43: 2796, 1983
- van Boxel JA, Stobo JD, Paul WE, Green I:
Antibody-dependent lymphoid cell-mediated cytotoxicity: no requirement
for thymus-derived lymphocytes.
Science 175: 194, 1972
- Boyum A:
Separation of leucocytes from blood and bone marrow.
Scand J Clin Lab Invest 21: 97, 1986
- Brown JP, Nishiyama K, Hellström I, Hellström KE:
Structural characterization of human melanoma associated antigen p97
with monoclonal antibodies.
J Immunol 127: 539, 1981
- Byfield JE, Zerubavel R, Fonkalsrud EW:
Antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated serotherapy against
murine neuroblastoma. I. In vitro and in vivo treatment using normal
X-radiated and immunestimulated rat effector cells.
Cancer Immunol Immunother 14: 117, 1982
- Cahan LD, Irie, RF, Singh R, Cassidenti A, Paulson JC:
Identification of a human neuroectodermal tumor antigen (OFA-I-2) as
ganglioside GD2.
Proc Natl Acad Sci USA 79: 7629, 1982
- Carrel S, de Tribolet N, Mach JP:
Expression of neuroectodermal antigens common to melanomas, gliomas,
and neuroblastomas.
Acta Neuropathol 57: 158, 1982
- Carrel S, Schmidt-Kessen A, Mach JP, Heumann D, Girardet C:
Expression of common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) on
human malignant melanoma cell lines.
J Immunol 130: 2456, 1983
- Cerottini J, Brunner T:
Cell-mediated cytotoxicity, allograft rejection and tumor immunity.
Adv Immunol 18: 67, 1974
- Coakham HB:
Surface antigen(s) common to human astrocytoma cells.
Nature 250: 328, 1974
- Coakham HB.
Immunology of human brain tumors.
Eur J Cancer Clin Oncol 20: 145, 1984

Coakham HB, Kornblith PL, Quindlen EA, Pollock LA, Wood WC, Harnett LC:

Autologous humoral response to human gliomas and analysis of certain cell surface antigens: In vitro studies with the use of microcytotoxicity and immune adherence assays.

J Natl Cancer Inst 64: 223, 1980

Cravioto H:

Immunology of experimental brain tumors.

In: Waters H (ed): Handbook of cancer immunology.

Garland STPM Press, New York London 1978

Dahme E, Müller B, Schröder B, Stavrou D:

Morphologische und zytochemische Befunde an zwei in vitro etablierten spontanen Hirntumoren des Hundes.

Berl Münch Tierärztl Wschr 93: 21-27, 1980

Davidson RL, Gerald PS:

Improved techniques for the induction of mammalian cell hybridization by polyethylene glycol.

Somatic Cell Genet 2: 165-176, 1976

Devries JE, Cornain S, Rümke P:

Cytotoxicity of non-T versus T-lymphocytes from melanoma patients and healthy donors on short- and long-term cultured melanoma cells.

Int J Cancer 14: 427, 1974

Dillman RO, Shawler DL, Sobol RE et al.:

Murine monoclonal antibody therapy in two patients with chronic lymphocytic leukemia.

Blood 59: 1036, 1982

Dippold WG, Knuth A, Meier zum Büschenfelde KH:

Inhibition of human melanoma cell growth in vitro by monoclonal anti-CD3-ganglioside antibody.

Cancer Res 44: 806, 1984

Dippold WG, Lloyd KO, Li LT, Ikeda M, Oettgen HF, Old LJ:

Cell surface antigens of human malignant melanoma: definition of six antigenic systems with mouse monoclonal antibodies.

Proc Natl Acad Sci USA 77: 6114, 1980

Esperik T, Hammerström J:

Human monocyte-mediated antibody dependent cytotoxicity to K-562 cells: an electron microscopic study.

Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect C 91: 211, 1983

van Ewijk W, Coffman RC, Weissman IL:

Immunoelectron microscopy of cell surface antigens: a quantitative analysis of antibody binding after different fixation protocols.

Histochem J 12 349, 1980

Fabre JW:

Differentiation antigens of the human central nervous system: identification with monoclonal antibodies and potential clinical value.

In: McMichael AJ (ed): Monoclonal antibodies in clinical medicine. Acad Press, 1982

Fazekas de St.Groth S, Scheidegger D:

Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics.

J Immunol Methods 35: 1-21, 1980

Froelich C, Bankhurst A:

NK and ADCC: characterization of the effector cells by E-rosetting on monoclonal antibodies.

Cell Immunol 78: 33, 1983

Galfré G, Butcher GW, Howard IC, Wilde CD, Milstein C:

Clonal competition and stability of hybrid myelomas of mouse and rat origin.

Transplant Proc XII: 371, 1980

Galfré G, Howe SC, Milstein C:

Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines.

Nature 266: 550-552, 1977

Garrigues HJ, Tilgen W, Hellström I, Hellström KE:

Detection of a human melanoma-associated antigen, p97, in histological sections of primary human melanomas.

Int J Cancer 29: 511, 1982

Gerhard W, Yewdell J, Frankel ME, Lopes AD, Staudt L:

Monoclonal antibodies against influenza virus.

In: Kennett RH, McKearn TJ, Bechtol KB (eds): Monoclonal Antibodies. Plenum Press, 1980

Goding JW:

Monoclonal antibodies: Principles and practice.

Academic Press Inc., 1983

Graham, RC, Karnovsky, MJ:

The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique.

J Histochem Cytochem 14: 291, 1966

Greaves M, Brown G:

Purification of human T- and B-lymphocytes.

J Immunol 112: 420, 1974

Greenberg AH, Shen L, Roitt IM:

Characterization of the antibody-dependent cytotoxic cell - a non-phagocytic monocyte?

Clin Exp Immunol 15: 251, 1973

Greenberg AH, Shen L, Walker L, Arnaiz-Villena A, Roitt IM:

Characteristics of the effector cells mediating cytotoxicity against antibody-coated target cells. II. The mouse nonadherent K cell.

Eur J Immunol 5: 474, 1975

Gupta S, Fernandes G, Nair M, Guod RA:

Spontaneous and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by human T-cell subpopulations.

Proc Natl Acad Sci USA 75: 5137, 1978

Harding B, Pudlfin DJ, Gotch F, MacLennan ICM:

Cytotoxic lymphocytes from rats depleted of thymus processed cells.

Nature (New Biol) 232: 80, 1971

Harris R, Ukaejiofo EO:

Tissue typing using a routine one-step lymphocyte separation technique.

Brit J Haematol 18: 229-235, 1970

Hansmann ML, Radzun HJ, Kaiserling E, Parwaresch MR:

Immunoelectron microscopic demonstration of tissue antigens with monoclonal antibodies.

Virchows Arch (Cell Pathol) 46: 1, 1984

Hellström I:

A colony inhibition technique for demonstration of tumor cell destruction by lymphoid cells in vitro.

Int J Cancer 2: 65, 1967

Hellström I, Garrigues HJ, Cabasco L et al.:

Studies of a high molecular weight human melanoma-associated antigen:

J Immunol 130: 1467, 1983

Hellström I, Hellström KE:

Studies on cellular immunity and its serum-mediated inhibition in Moloney-virus-induced mouse sarcomas.

Int J Cancer 4: 587, 1969

Hellström I, Hellström KE:

Colony inhibition and cytotoxic assay. In vitro methods of cell-mediated immunity.

Eds.: Bloom BR, Glade PR, N.Y. Academic Press: 409, 1971

Hellström I, Hellström KE, Pierce GE, Bill AH:
Demonstration of cell-bound and humoral immunity against
neuroblastoma cells.
Proc Nat Acad Sci 60: 1231, 1968

Helson L, Helson C, Weinberger C:
DW.1 monoclonal antibody and neuroectodermal tumors.
Proc Amer Assn Cancer Res 24: 130, 1983

Hengartner H, Luzzati AL, Schreier M:
Fusion of in vitro immunized lymphoid cells with X63-Ag.8.
Curr Top Microbiol Immunol 81: 92-99, 1978

Herbermann RB:
Immunogenicity of tumor antigens.
Biochem Biophys Acta 473: 93, 1977

Herlyn D, Herlyn M, Steplewski Z, Koprowski H:
Monoclonal antibodies in cell-mediated cytotoxicity against human
melanoma and colorectal carcinoma.
Eur J Immunol 9: 657, 1979

Herlyn D, Koprowski H:
IgG2a monoclonal antibodies inhibit human tumor growth through
interaction with effector cells.
Proc Natl Acad Sci USA 79: 4761-4765, 1982

Herlyn D, Powe J, Ross AH, Herlyn M, Koprowski H:
Inhibition of human tumor growth by IgG2a monoclonal antibodies
correlates with antibody density on tumor cells.
J Immunol 134: 1300, 1985

Herlyn M, Clark HH, Mastrangelo MJM et al.:
Specific immunoreactivity of hybridoma-secreted monoclonal antimela-
noma antibodies to cultured cells and freshly derived human cells.
Cancer Res 40: 3602, 1980

Herlyn M, Steplewski Z, Koprowski H:
Antigens detected by monoclonal antibodies against human melanoma.
Proc Am Assoc Cancer Res 21: 210, 1980

Houghton AH, Brooks H, Cote RJ, Taormina MC, Oettgen HF, Old LJ:
Detection of cell surface and intracellular antigens by human
monoclonal antibodies.
J Exp Med 158: 53, 1983

Hsu SM, Raine L, Fanger H:
Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase
techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP)
procedures.
J Histochem Cytochem 29: 577-580, 1981

Imai K, Glassy MC, Fetone S:

ADCC of cultured human melanoma cells: Analysis with monoclonal antibodies to human melanom-associated antigens.

Scand J Immunol 14: 369, 1981

Jonak ZL:

Isolation of monoclonal antibodies from supernatant by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation.

In: Kennett RH (ed.): Monoclonal antibodies.

Plenum Press, 1980

Jones JF, Segal DM:

Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) with antibody-coated effectors: New methods for enhancing antibody binding and cytotoxicity.

J Immunol 125: 926, 1980

Kearney JF, Radbruch A, Liesegang B, Rajewsky K:

A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody secreting hybrid cell lines.

J Immunol 123: 1548-1550, 1979

Kennett RH, Gilbert F:

Hybrid myelomas producing antibodies against a human neuroblastoma antigen present on fetal brain.

Science 203: 1120, 1979

Kennett RH, Jonak ZL, Bechtol KB:

Monoclonal antibodies against human tumor-associated antigens.

In: Kennett RH (ed): Monoclonal antibodies. Plenum Press, 1980

Klein G:

Tumor antigens.

Amer Rev Microbiol 20: 223, 1966

Köhler G, Howe SC, Milstein C:

Fusion between immunoglobulinsecreting and nonsecreting myeloma cell lines.

Eur J Immunol 6: 292, 1976

Köhler G, Milstein C:

Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity.

Nature 256: 495, 1975

Koprowski H, Steplewski Z, Herlyn D, Herlyn M:

Study of antibodies against human melanoma produced by somatic cell hybrids.

Proc Natl Acad Sci USA 75: 3405, 1978

Kornblith PL, Dohan FC, Wood WC, Whitman BD:
Human astrocytoma: Serum-mediated immunologic response.
Cancer 33, 1512, 1974

Kurnick JT, Oestberg L et al.:
A rapid method for the separation of functional lymphoid cell
populations of human and animal origin on PVC-Silica (Percoll)
density gradients.
Scand J Immunol 10: 563, 1979

Lamon EW, Whitten HD, Skurzak HM, Andersson B, Lidin B:
IgM antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the Moloney
sarcoma virus system: the involvement of T and B lymphocytes as
effector cells.
J Immunol 115: 1288, 1975a

Lamon EW, Whitten HD, Lidin B, Fudenberg HH:
IgM-induced tumor cell cytotoxicity mediated by normal thymocytes.
J Exp Med 142: 542, 1975b

Lamon EW, Shaw MW, Goodson S, Lidin B, Walia AS, Fuson EW:
Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the Moloney sarcoma
virus system: differential activity of IgG and IgM with different
subpopulations of lymphocytes.
J Exp Med 145: 302, 1977

Lamon EW, Kearney JF:
Monoclonal IgM antibodies that induce T-cell-mediated cytotoxicity of
murine sarcoma cells.
In: Miami Winter Symposia 1982 Vol 19. Academic Press, New York

Langlois AJ, Matthews T, Rolson GJ, Thiel HJ, Collins JJ,
Bolognesi DP:
J Immunol 126: 2337, 1981

Lee VMY, Page CD, Wu HL, Schlaepfer WW:
Monoclonal antibodies to gel-excised glial filament protein and their
reactivities with other intermediate filament proteins.
J of Neurochemistry 42:25, 1984

Lemonnier F, Burakoff SJ, Germain RN, Benacerraf B:
Cytolytic thymus-derived lymphocytes for allogenic stimulator cells
crossreact with chemically modified syngeneic cells.
Proc Natl Acad Sci USA 74: 1229-1233, 1977

Liao SK, Clarke BJ, Kwong PC, Brickerden A, Gallie B, Deut PB:
Common neuroectodermal antigens on human melanoma, neuroblastoma,
retinoblastoma, glioblastoma and fetal brain revealed by hybridoma
antibodies raised against melanoma cells.
Eur J Immunol 11: 450, 1981

Libert A, Ghanem G, Arnould R, Vercammen A, Carrel S, Lejeune F:
Monoclonal antibodies to human melanoma associated antigens: Study of
their specificity and visualization at the cellular level of the
antigenic distribution.
Anticancer Res 3: 219, 1983

Lindmo T, Davies C, Rovstad EK, Fodstad O, Sundan A:
Antigen expression in human melanoma cells in relation to growth
conditions and cell-cycle distribution.
Int J Cancer 33: 167, 1984

Littlefield JW:
Selection of hybrids from mastings of fibroblasts in vitro and their
presumed recombinations.
Science 145: 709, 1964

MacLennan ICM:
Antibody in the induction and inhibition of lymphocyte cytotoxicity.
Transplant Rev 13: 67, 1972

Mahaley MS:
Immunological aspects of the growth and development of human and
experimental brain tumors. The experimental biology of brain tumors.
Thomas, Springfield, 1972

McCarron RM, Goroff DK, Luhr JE, Murphy MA, Herscovitz HB:
Methods for the collection of peritoneal and alveolar macrophages.
In: Methods in Enzymology 108: 274, 1984

Mellert W:
Bindungseigenschaften monoklonaler Antikörper gegen experimentelle
Gliome in vitro und in vivo.
Diss med vet, München, 1984

Miedema F, Tetteroo PAT, Hesselink WG, Werner G, Spits H, Melief CJM:
Both Fc receptors and lymphocyte-function-associated antigen 1 on
human T-lymphocytes are required for antibody-dependent cellular
cytotoxicity (killer cell activity).
Eur J Immunol 14: 518, 1984

Miller RA, Levy R:
Response of cutaneous T cell lymphoma to therapy with hybridoma
monoclonal antibody.
Lancet II: 226, 1981

Miller RA, Maloney DG, McKillop J, Levy R:
In vivo effects of murine hybridoma antibody in a patient with T-cell
leucemia.
Blood 58: 78, 1981

Miller RA, Maloney DG, Warnke R, Levy R:
Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody.
New Engl J of Medicine 306: 517, 1982

Milstein C, Clark MR, Galfré G, Cuello AC:
Monoclonal antibodies from hybrid myelomas.
In: Fougereau M, Dausset J (eds): Progress in Immunology.
Academic Press, New York 1980

Milstein C, Lennox E:
Curr Top Dev Biol 14: 1, 1980

Mitchell KF, Fuhrer JP, Steplewski Z, Koprowski H:
Structural characterisation of the 'melanoma-specific' antigen
detected by monoclonal antibody 691I5Nu-4-B.
Molecular Immunol 18: 207, 1981

Möller E:
Contact-induced cytotoxicity by lymphoid cells containing foreign
isoantigens.
Science 147: 873, 1965

Mosier DE:
Separation of macrophages on plastic and glass surfaces.
In: Methods in Enzymology 108: 294, 1984

Müller B:
In vitro Etablierung und partielle Charakterisierung von zwei
spontanen Hirntumoren des Hundes.
Diss med vet, München, 1978

de Muralt B, de Tribolet N, Diserens AC, Carrel S, Mach JP:
Reactivity of anti glioma monoclonal antibodies for a large panel of
cultured gliomas and other neuroectoderm derived tumors.
In press

Nexø BA:
A plaque assay for murine leukemia virus using enzyme-coupled
antibodies.
Virology 77: 849-852, 1977

Oger J, Szuchet S, Antel J, Arnason BGW:
A monoclonal antibody against human T supressor lymphocytes binds
specifically to the surface of cultured oligodendrocytes.
Nature 295: 66, 1982

Oi VT, Jones PP, Codnig JW, Herzenberg LA:
Curr Top Microbiol Immunol 81: 115, 1978

Old LJ, Boyse EA:

Immunology of experimental tumors.

Amer Rev Med 15: 167, 1969

O'Toole C, Perlmann P, Wiczell H, Unsqaard B, Zetterlund CG:
Lymphocyte cytotoxicity in bladder cancer no requirement for
thymus-derived effector cells?

Lancet I: 1085, 1973

Ouchterlony Ö:

Diffusions-In-gel-methods for immunological analysis II.

Progr Allergy 6: 30-154, 1962

Parshad R, Sanford KK:

Effect of horse serum, fetal calf serum and bovine serum on neo-
plastic conversions and chromosomes of mouse embryo cells in vitro.

J Natl Cancer Inst 41: 767, 1968

Pateraki E, Guesdon JL, Serie C, Avrameas S:

TERELISA: the ELISA test performed in Terasaki plates.

J Immunol Meth 46: 361-368, 1981

Perlmann P, Holm G:

Cytotoxic effect of lymphoid cells.

Adv Immunol 11: 117, 1969

Perlmann P, Perlmann H, Wiczell H:

Lymphocyte mediated cytotoxicity in vitro induction and inhibition by
humoral antibody and nature of effector cells.

Transplant Rev 13: 91, 1972

Pfreundschuh M, Shiku H, Takahshi I et al.:

Serological analysis of cell surface antigens of human malignant
brain tumors.

Proc Natl Acad Sci USA 75: 5122, 1978

Posner MR, Antoniou D, Griffin J, Schlossman SF, Lazarus H:

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of
monoclonal antibodies to cell surface antigens on viable cells.

J Immunol Methods 48: 23-31, 1982

Puchtler H, McLoan SN:

On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on
immunohistochemical reactions.

Histochemistry 82: 201, 1985

Pukel CS, Lloyd KO, Travassos LR, Dippold WG, Oettgen HF, Old LJ:

C_{D3}, a prominent ganglioside of human melanoma. Detection and
characterization by mouse monoclonal antibody.

J Exp Med 155: 1133, 1982

Reif AE, Allen JM:

The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues.

J Exp Med 120: 413, 1964

Ross AH, Mitchell KF, Steplewski Z, Koprowski H:

Identification and isolation of melanoma-associated antigens with monoclonal antibodies.

Hybridoma 1: 413, 1982

Ritz J, Pesando JM, Sallan SE et al.:

Serotherapy of acute lymphoblastic leukemia with monoclonal antibody. Blood 58: 141, 1981

Santoni A, Herbermann RB, Holden HT:

Correlation between natural and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against tumor targets in mouse. II. Characterization of the effector cells.

JNCI 63: 995, 1979

Saxton RE, Torbett M, Nestor M, Fairhurst M, Cochran AJ et al.:

Four distinct melanoma cell surface antigens derived by monoclonal antibodies.

Proc Amer Assn Cancer Res 24: 894, 1983

Schmitt HD:

Produktion und immunochemische Darstellung der Bindungseigenschaften monoklonaler Antikörper gegen spontane Hirntumoren des Hundes.

Diss med vet, München, 1986

Schnegg FJ, de Tribolet N, Diserens AC, Martin-Achard A, Carrel S:

Characterization of a rabbit anti-human malignant glioma antiserum. Int J Cancer 28: 265, 1981a

Schnegg FJ, Diserens AC, Carrel S, Accolla RS, de Tribolet N:

Human glioma-associated antigens detected by monoclonal antibodies. Cancer Res 41: 1209, 1981b

Sears HF, Atkinson BF, Mattis J et al.:

Phase-I-clinical trial of monoclonal antibody in treatment of gastrointestinal tumors.

Lancet 1: 762, 1982

Sears HF, Herlyn D, Steplewski Z, Koprowski H:

Effects of monoclonal antibody immunotherapy on patients with gastrointestinal adenocarcinoma.

J Biol Resp Mod 3: 138, 1984

Seeger RC, Danon VL, Rayner SA, Hoover S:
Definition of Thy-1 determinant on human neoblastoma, glioma, sarkoma
and teratoma cells with a monoclonal antibody.
J Immunol 128: 983, 1982

Seeger RC, Rosenblatt HM, Imai K, Ferrone S:
Common antigenic determinants on human melanoma, glioma,
neuroblastoma and sarcoma cells defined with monoclonal antibodies.
Cancer Res 41: 2714, 1981

Seto MT, Takahashi T, Nakamura S, Nishizuka Y:
In vivo anti-tumor effects of monoclonal antibodies with different
immunoglobulin classes.
Cancer Res 43: 4768, 1983

Sikora K, Alderson T:
Human hybridomas from malignant gliomas.
The Lancet 2: 11, 1982

Sikora K, Phillips J:
Human monoclonal antibodies to glioma cells.
Brit J Cancer 43: 105, 1981

Solheid C, Lauro G, Palladine G:
Two separate membrane-bound antigens on human glioma cells in tissue
culture detected with sera from glioma patients by
immunofluorescence.
J Neurol Sci 30: 55, 1976

Stavrou D, Bilzer Th, Hulten M, Zänker KS, Anzil AP, Haglid KG,
Dahme E:
Immunological aspects of experimental brain tumors.
Anticancer Res 2: 151-156, 1982

Stavrou D, Elling H, Haglid KG:
Demonstration of humoral antibodies against autologous cells in
experimental rabbit gliomas.
J Neuropath Exp Neurol 37: 694, 1978

Stavrou D, Hulten M, Anzil AP, Bilzer T:
The humoral antibody response of rats immunized with chemically
modified syngeneic brain cells and glioma cells.
Int J Cancer 26: 629-637, 1980

Stavrou D, Süss C, Bilzer T, Kummer U, de Tribolet N:
Monoclonal antibodies reactive with glioma cell lines derived from
experimental brain tumors.
Eur J Cancer Clin Oncol 19: 1439-1449, 1983

Stavrou D, Süß C, Bilzer T, Kummer U, de Tribolet N:
Glioma associated antigens detected by monoclonal antibodies.
Anticancer Res 4: 15, 1984

Sternberger, LA:
Some new developments in immunocytochemistry.
Microscopy 25: 346-361, 1969

Steplewski Z, Herlyn D, Maul G, Koprowski H:
Hypothesis: Macrophages as effector cells for human tumor destruction
mediated by monoclonal antibody.
Hybridoma 2: 1, 1983

Steplewski Z, Lubeck MD, Koprowski H:
Human macrophages armed with murine immunoglobulin G2a antibodies to
tumors destroy human cancer cells.
Science 221: 865, 1983

SÜß Ch:
Produktion monoklonaler Antikörper gegen experimentelle Gliome durch
Fusion von Mausmyelomzellen (X63-Aq8.653) und Maussplenocyten.
Diss med vet, München, 1983

Sugasawara RJ, Cahoon BE, Karu AE:
The influence of murine macrophage-conditioned medium on cloning
efficiency, antibody synthesis and growth rate of hybridomas.
J Immunol Meth 79: 263, 1985

Takasugi M, Klein KE:
A microassay for cell-mediated immunity.
Transplant 9: 219, 1970

Taylor CR:
Monoclonal antibodies and 'routine' paraffin sections.
Arch Path Lab Meth 109: 115, 1985

Thust R:
Karyotypveränderungen in Klonen eines N-Methylnitrososharstoff
induzierten euklyden Sarkoms des Rückenmarks der Ratte in vitro.
Exp Path 5: 226, 1971

de Tribolet N, de Murali B, Diserens AC et al.:
Reactivity spectrum of monoclonal antibodies to human gliomas.
J Neuroimmunol 3: 239, 1982

Tomita Y, Montagne PM, Hearing VJ:
Monoclonal antibody production to a B16 melanoma associated antigen.
Int J Cancer 35: 543; 1985

- Vainio T, Koskimies O, Perlmann P, Perlmann H, Klein E:
In vitro cytotoxic effect of lymphoid cells from mice immunized with
allogenic tissue.
Nature 204: 453, 1964
- Van Oers MHJ, Zeijlemaker WP, Schellekens PT:
Eur J Immunol 7: 143, 1977
- Vollmers HP, Birchmeier W:
Monoclonal antibodies inhibit the adhesion of mouse B16 melanoma
cells in vitro and block the lung metastasis in vivo.
Proc Nat Acad Sci USA 80: 3729, 1983
- Wahlén B, Perlmann H, Perlmann P:
Analysis by a plaque assay of IgG- or IgM-dependent cytolytic
lymphocytes in human blood.
J Exp Med 144: 1375, 1976
- Wahlström T, Linder E, Saksela E, Westermark B:
Tumor specific membrane antigens in established cell lines from
gliomas.
Cancer 34: 274, 1974
- Wahlström T, Saksela E, Troupp H:
Cell bound antiglial immunity in patients with malignant tumors of
the brain.
Cell Immunol 6: 161, 1973
- Walker MD, Alexander E, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS et al.:
Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic
gliomas.
J Neurosurg 49: 333, 1978
- Walker WS, Beelen RHJ, Buckley PJ, Melvin SL, Yen SE:
Some fixation reagents reduce or abolish the detectability of I
antigen and HLA-DR on cells.
J Immunol Methods 67: 89, 1984
- Wells DE, Price PJ:
Simple rapid methods for freezing hybridomas in 96-well microculture
plates.
J Immunol Meth 59: 49-52, 1983
- Wigzell H:
Quantitative titrations of mouse H-2 antibodies using Cr51-labelled
target cells.
Transplantation 3: 423, 1965

Wikstrand CJ, Bigner DD:

Surface antigens of human glioma cells shared with normal and fetal brain.

Cancer Res 39: 3235, 1979

Wikstrand CJ, Bigner DD:

Expression of human fetal brain antigens by human tumors of neuroectodermal origin as defined by monoclonal antibodies.

Cancer Res 42: 267, 1982

Wikstrand CJ, Bigner DD:

Use of monoclonal antibodies in neurobiology and neurooncology.

In: Sell S, Reisfeld R (eds): Monoclonal antibodies in cancer.

Humana press, Clifton, New Jersey: 365, 1985

Wikstrand CJ, Mahaley MS, Bigner DD:

Surface Antigenic characteristics of human glial brain tumor cells.

cancer Res 37: 4267, 1977

Wood WC, Morton DL:

Microcytotoxicity test: Detection in sarcoma patients of antibody cytotoxic to human sarcoma cells.

Science 170: 1318, 1970

Wysocki LJ, Sato VL:

"Panning" for lymphocytes: A method for cell selection.

Proc Natl Acad Sci USA 75: 2844-2848, 1978

Yamada K, Hayakawa T, Ushio Y et al.:

Regional blood flow and capillary permeability in the ethylnitrosourea-induced rat glioma.

J Neurosurg 55: 922, 1984

Yeh MJ, Hellström I, Hellström KE:

Clonal variation in expression of a human melanoma antigen defined by a monoclonal antibody.

J Immunol 126: 1312, 1981

Yeh MJ, Hellström I, Brown JP, Warner GH, Hansen JA, Hellström KE:

Cell surface antigen of a human melanoma identified by monoclonal antibody.

Proc Nat Acad Sci USA 76: 2927

Young WH, Hakomori SI:

Therapy of mouse lymphoma with monoclonal antibodies to glycolipid: selection of low antigenic variants in vivo.

Science 211: 487, 1981

Zöller M, Andrichetto GC, Heymann B:

Natural and antibody-dependent killer cells in the thymus.

Eur J Immunol 12: 914, 1982

Zöller M, Andrichetto GC, Heymann B, Lamon EW, Wigzell H:
Characterization of effector cells mediatively IgG and IgM
antibody-dependent cellular cytotoxicity.
Scand J Immunol 17: 19, 1973

Zur Hausen H, Lange A, Fröhlich J:
Die Serumkonzentration als Auslesefaktor in der Gewebekultur.
Cytogenetische Untersuchungen an Mäusefibroblasten.
Cytologia 31: 339, 1966

Herrn Professor Dr. E. Dahme danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Th. Bilzer für die fachliche Beratung und seine große Hilfsbereitschaft bei allen Problemen.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich Frau G. Boie, welche mir bei der Durchführung vieler Experimente eine wertvolle Hilfe war.

Für ihre technische Unterstützung bedanke ich mich bei Frau D. Wallmann, Frau A. Lechner und allen anderen Mitarbeitern des Instituts.

Schließlich danke ich meinen Kollegen Dr. D. Schmitt und Dr. H. Glässner für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Lebenslauf

Name: Simon Jakob Aumann

Geboren: am 04.06.1959 in Zillendorf

Eltern: Michael Aumann, Landwirt
Frieda Aumann, geb. Wagner

Familienstand: verheiratet mit Elisabeth Aumann,
geb. Kermer, Ärztin

Schulbildung: Grundschule 1965 - 1969 in Zillendorf
Gymnasium 1969 - 1978 in Cham
Allgemeine Hochschulreife am 29.06.1978

Wehrdienst: 07.1978 - 10.1979

Studium: Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität München ab Wintersem. 1979

Tierärztliche Prüfung am 29.11.1984

Approbation: 16.01.1985

Promotion: Seit 12.1984 am Institut für Tierpatho-
logie und Neuropathologie (Professor
Dr. E. Dahme) der Universität München
mit einem Stipendium zur Förderung des
wissenschaftlichen Nachwuchses in
Bayern

Beruf: Seit 01.08.1986 tätig als Assistenz-
tierarzt

